

**ROSIANE GUETTER MELLO ZIBETTI**

**DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA DE POLISSACARÍDEOS ISOLADOS DE  
ALGAS PERTENCENTES À ORDEM HALYMENIALES (RHODOPHYTA).**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em  
Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências  
Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito  
parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Eugênia Duarte  
Nosedá

Co-orientador: Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá

**CURITIBA**

**2005**

**ROSIANE GUETTER MELLO ZIBETTI**

# **DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA DE POLISSACARÍDEOS ISOLADOS DE ALGAS PERTENCENTES À ORDEM HALYMENIALES (RHODOPHYTA).**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Eugênia Duarte Nosedá

Co-orientador: Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá

**CURITIBA**

**2005**

**AGRADECIMENTOS**

Agradeço à Professora Maria Eugênia Duarte Nosedá, pela orientação, estímulo, amizade e força em todos os momentos da realização deste trabalho, e ao Professor Miguel Daniel Nosedá, pela orientação, troca de idéias e amizade.

Agradeço a todos professores do curso de pós-graduação em Bioquímica que muito contribuíram para minha formação, em especial aos professores Philip Albert James Gorin e Guilherme Lanzi Sasaki pelas valiosas contribuições na correção interna deste trabalho.

Em especial agradeço aos meus pais Gilberto Lobo Mello e Rosilene Guetter Mello, pelo apoio a toda hora, pois sem a ajuda incondicional de vocês com certeza este trabalho não estaria pronto. Obrigado por tudo, como sempre digo agradeço a Deus por serem meus pais. Amo vocês!!!

Ao meu marido Geomar D. Zibetti, agradeço do fundo do coração em resistir ao meu lado nesta etapa de minha vida, obrigado por participar comigo nas coletas, nos congressos, enfim obrigado por tudo que você teve que renegar por causa do meu objetivo.

A minha filha Rocielle, obrigada por entender a minha ausência, e por ser este anjinho muito alegre que sempre está iluminando minha vida. Te amo filha.

Ao meu sogro (Donato), sogra (Nelis) e minha cunhada (Giovana), pelo apoio e pelos braços sempre abertos, abrigada.

Ao meu irmão Ricardo que mesmo longe sempre me deu apoio para seguir em frente.

Ao amigo irmão Adriano G. Viana, bom como posso explicar o quanto tenho que te agradecer, acho que deve sentir o mesmo, obrigado pelo teu apoio incondicional e pela tua alegria contagiante que sempre esteve presente no nosso dia-a-dia. É amigo, nós conseguimos!

A minha amiga Paula Cristina de Sousa Faria carinhosamente Paulinha, obrigada pelo apoio a toda hora e enriquecimento de nossa amizade, pois você não é uma colega que passou pela minha vida e sim é uma amiga para toda a vida.

Jujuba (Juliana Emanuela Cassolato), minha amiga, minha vizinha, nossa como foi bom ter te conhecido (loca que nem nós), obrigada pela tua amizade sempre sincera, você é uma pessoa brilhante em tudo que faz.

Marco André Cardoso (Marquito), obrigado pela sua amizade e sempre disposição a ajudar, valeu, você também é um talento em tudo que faz.

Obrigada a todos os colegas do laboratório de Química de carboidratos de algas marinhas, Alan, Diogo, Sérgio, Francielly, Robson e Tayna, foi muito bom ter convivido com vocês.

Ao amigo Rodris (Rodrigo Vassoler), obrigado por todo apoio e principalmente por sempre estender as mãos na hora que mais precisei.

A amiga Fefe (Fernanda Simas), nossa nunca tinha conhecido alguém tão teimosa como eu, valeu amiga é muito bom ter a sua amizade e escutar as suas críticas construtivas, obrigada.

Aos amigos Ricardo Wagner, Tales, Elaine, Juliana Curi, Lucimara e em especial a Caroline Grassi Melingher pela força e trocas de idéia e sempre disposição a ajudar.

A Dra. Silvia Maria Pitta de Beuclair Guimarães do Instituto de Botânica de São Paulo, por ter me recebido em seu laboratório, e com toda paciência do mundo passar o seu valioso conhecimento, sem o qual não teria nem chegado perto das Halymeniales.

Ao Dr. Alberto Saul Cerezo pela valiosa colaboração científica com o grupo de Carboidratos de algas marinhas da UFPR.

Ao Dr. José Esteves e a Dra. Marina Ciancia da Universidade de Buenos Aires, pelas análises enantioméricas.

A Dra. Elza Damonte e ao Dr. Carlos Pujol da universidade de Buenos Aires pelas análises antivirais.

As bibliotecárias, em especial a Telma e Isabela pelas suas atenções de suma importância para a qualidade deste trabalho.

A CAPES, FUNPAR e ao PRONEX-Carboidratos pelo apoio financeiro.

**Dedico este trabalho aos eternos super-heróis da minha vida, Gilberto Lobo Mello e Rosilene Guetter Mello.**

## **SUMÁRIO**

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>v</b>
<b>LISTA DE TABELAS E ESQUEMAS.....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....</b>	<b>xii</b>

<b>RESUMO.....</b>	<b>xiv</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xv</b>
<b>1- INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1- ALGAS VERMELHAS.....	1
1.2- GALACTANAS: ESTRUTURA GERAL.....	2
1.3- GALACTANAS: CLASSIFICAÇÃO.....	3
1.3.1- GALACTANAS DO TIPO CARRAGENANAS.....	4
1.3.2- GALACTANAS DO TIPO AGARANAS.....	7
1.3.3- GALACTANAS DO TIPO DL-HÍBRIDA.....	9
1.4- ALGAS PRODUTORAS DE CARRAGENANAS.....	11
1.4.1- ORDEM GIGARTINALES.....	11
1.5- ALGAS PRODUTORAS DE AGARANAS.....	14
1.5.1- ORDEM GELIDIALES E GRACILARIALES.....	14
1.5.2- ORDEM CERAMIALES.....	16
1.6- ALGAS PRODUTORAS DE GALACTANAS DO TIPO DL-HÍBRIDAS.....	18
1.6.1- ORDENS RHODYMENIALES E PLOCAMIALES.....	18
1.6.2- ORDEM HALYMENIALES.....	19
1.7- APLICAÇÃO DAS GALACTANAS SULFATADAS.....	26
1.7.1- APLICAÇÃO INDUSTRIAL.....	26
1.7.2 APLICAÇÃO BIOLÓGICA.....	28
<b>2- OBJETIVOS.....</b>	<b>30</b>
2.1- OBJETIVO GERAL.....	30
2.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
<b>3- MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
3.1- MÉTODOS ANALÍTICOS GERAIS.....	31
3.2-ESPÉCIES ESTUDADAS E SEUS POSICIONAMENTOS SISTEMÁTICOS.....	32
3.3- COLETA E PROCESSAMENTO.....	33
3.4- EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS.....	33

3.4.1- EXTRAÇÃO DAS GALACTANAS DE <i>Cryptonemia crenulata</i> E <i>Cryptonemia seminervis</i> .....	33
3.4.2- EXTRAÇÃO DAS GALACTANAS DE <i>Halymenia floridana</i> .....	34
3.5- TRATAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS COM KCl.....	34
3.6- PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE <i>C. seminervis</i> POR CROMATOGRAFIA DE TROCA-IÔNICA.....	35
3.7- HIDRÓLISE ÁCIDA TOTAL DO TIPO HIDRÓLISE REDUTIVA.....	35
3.8- HIDRÓLISE ÁCIDA TOTAL.....	36
3.9- DESSULFATAÇÃO POR TRATAMENTO SOLVOLÍTICO.....	36
3.9.1- PREPARO DO SAL DE PIRIDÔNIO.....	36
3.9.2- SOLVÓLISE.....	37
3.10- TRATAMENTO ALCALINO.....	37
3.10.1- TRATAMENTO ALCALINO ANALÍTICO.....	37
3.10.2- DETERMINAÇÃO DO TEOR DE 3,6-anidrogalactose.....	38
3.10.3- TRATAMENTO ALCALINO PREPARATIVO.....	38
3.11- DETERMINAÇÃO DA CONFIGURAÇÃO ENANTIOMÉRICA.....	39
3.12- METILAÇÃO.....	40
3.13- MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS.....	40
3.13.1-CROMATOGRAFIA LÍQUIDO-GASOSA.....	40
3.13.2-CROMATOGRAFIA LÍQUIDO-GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA (CG-EM).....	41
3.13.3- CROMATOGRAFIA DE GEL PERMEAÇÃO (HPSEC-MALLS) – ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE E MASSA MOLECULAR.....	41
3.14- DESPOLIMERIZAÇÃO DAS GALACTANAS UTILIZANDO HIDRÓLISE REDUTIVA PARCIAL.....	43
3.15-FRACIONAMENTO E PURIFICAÇÃO DAS GALACTANAS PARCIALMENTE DESPOLIMERIZADAS OBTIDAS POR HIDRÓLISE REDUTIVA PARCIAL.....	44
3.16- RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.....	45



3.16.1- RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE CARBONO-13 (RMN - $^{13}\text{C}$ ).....	45
3.16.2- RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE PRÓTON (RMN – $^1\text{H}$ ).....	45
3.16.3- HMQC (HETERONUCLEAR MULTIPLE QUANTUM CORRELATION SPECTROSCOPY).....	46
3.17- ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR).....	46
3.18-DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIHERPÉTICA DAS GALACTANAS DE <i>C. crenulata</i> .....	46
3.18.1- ENSAIO CITOTÓXICO.....	47
3.18.2- FORMAÇÃO DE PLACAS EM CÉLULAS Vero.....	48
3.18.3- DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL <i>in vitro</i> .....	48
3.18.4- DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE VIRUCIDA <i>in vivo</i> .....	50
3.18.5- ENSAIO <i>in vivo</i> DE PROTEÇÃO A INFECÇÃO PELO HSV-2....	51
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
4.1- RESULTADOS E DISCUSSÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE <i>Cryptonemia crenulata</i> .....	52
4.1.1-OBTENÇÃO E ANÁLISES DAS FRAÇÕES BRUTAS DE <i>C. crenulata</i> .....	52
4.1.2- ANALISES GERAIS DE C2S-3.....	58
4.1.3- DESSULFATAÇÃO SOLVOLÍTICA DA GALACTANA C2S-3.....	59
4.1.4- TRATAMENTO ALCALINO DA GALACTANA C2S-3.....	60
4.1.5- ANÁLISE DE (TRIDEUTERO)METILAÇÃO DA GALACTANA NATIVA (C2S-3), DESSULFATADA (C2S-3D) E SUBMETIDA A TRATAMENTO ALCALINO (C2S-3T) .....	61
4.1.6- ESPECTROSCOPIA DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DAS FRAÇÕES C2S-3, C2S-3D.....	65
4.1.7- ESTUDO DA CINÉTICA DE CICLIZAÇÃO ALCALINA.....	70
4.1.8- DESPOLIMERIZAÇÃO DA GALACTANA C2S-3.....	75

4.1.9- ANÁLISES GERAIS DA FRAÇÃO C1S.....	85
4.1.10- PURIFICAÇÃO DE C1S .....	88
4.1.11- CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE C1S-3.....	92
4.1.11.1 - DESSULFATAÇÃO SOLVOLÍTICA DE C1S-3.....	92
4.1.11.2 - ESPECTROSCOPIA DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DAS FRAÇÕES C1S-3 E C1S-3D.....	93
4.1.11.3 –METILAÇÃO DAS GALACTANAS C1S-3 E C1S-3D.....	95
4.1.12- GALACTANAS DL-HÍBRIDAS VERSUS MISTURAS DE DIASTERIOISÔMEROS.....	98
4.1.13- ATIVIDADE ANTIHERPÉTICA DAS GALACTANAS DE <i>C.</i> <i>crenulata</i> E SUA CORRELAÇÃO COM A ESTRUTURA.....	99
4.2- RESULTADOS E DISCUSSÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE <i>Cryptonemia seminervis</i> .....	109
4.2.1 OBTENÇÃO E ANÁLISES DAS FRAÇÕES BRUTAS DE <i>C.</i> <i>seminervis</i> .....	109
4.2.2- PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO S2S.....	121
4.2.3- CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE S2S-3.....	125
4.2.3.1- ANÁLISE ENANTIOMÉRICA E ESPECTROSCOPIA DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DE S2S-3.....	125
4.2.3.2- DESSULFATAÇÃO SOLVOLÍTICA DE S2S-3.....	129
4.2.3.3- TRATAMENTO ALCALINO DE S2S-3.....	137
4.2.3.4- ANÁLISE DE (TRIDEUTERO)METILAÇÃO DA GALACTANA NATIVA (S2S-3), DESSULFATADA (S2S-3D) E SUBMETIDA A TRATAMENTO ALCALINO (S2S-3T) .....	142
4.2.3.4- DESPOLIMERIZAÇÃO PARCIAL DA GALACTANA S2S-3.....	151
4.3- RESULTADOS E DISCUSSÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE <i>Halymenia</i> <i>floridana</i> .....	158
4.3.1- OBTENÇÃO E ANÁLISES DAS FRAÇÕES BRUTAS DE <i>H.</i> <i>floridana</i> .....	158
4.3.2- CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE HS.....	164
4.3.2.1- ESPECTROSCOPIA DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DE HS.....	164

4.3.2.2- DESSULFATAÇÃO SOLVOLÍTICA DE HS.....	166
4.4- COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DE ANÁLISES ESTRUTURAIS DAS GALACTANAS HOMOGÊNEAS C2S-3, S2S-3 E HS.....	172
5.0- CONCLUSÕES.....	177
6.0- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	179
ANEXOS.....	199

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA-1 ESTRUTURA BÁSICA REPETITIVA DE CARRAGENANAS, (UNIDADES D- ALTERNANTES).....	4
---	---

FIGURA-2 ESTRUTURA BÁSICA REPETITIVA DE AGARANAS, (UNIDADES D- E L- ALTERNANTES).....	8
FIGURA-3 FOTO DA ALGA <i>C. crenulata</i> .....	52
FIGURA-4 ESPECTROS DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DAS GALACTANAS C2S-3(A) e C2S-3D (B).....	69
FIGURA-5 DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE VELOCIDADE DA REAÇÃO DE CICLIZAÇÃO DA FRAÇÃO C2S-3 À 80°C.....	71
FIGURA-6 ESTRUTURA DA AGAROSE E DO SEU PRODUTO DE HIDRÓLISE REDUTIVA PARCIAL AGAROBIITOL.....	76
FIGURA-7 PERFIL DE ELUIÇÃO DA CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA (DEAE-SEPHADEX A-25) PRODUTO DE HIDRÓLISE REDUTIVA PARCIAL DA FRAÇÃO C2S-3 DA ALGA <i>C. crenulata</i> .....	78
FIGURA-8 PERFIL DA CROMATOGRAFIA DE GEL FILTRAÇÃO (BioGel-P2) DA FRAÇÃO CC.....	78
FIGURA-9 PERFIL DA CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO (BioGel-P2) DA FRAÇÃO CD.....	79
FIGURA-10 ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE DA FRAÇÃO CC POR CROMATOGRAFIA DE GEL PERMEAÇÃO (HPSEC-MALLS).....	79
FIGURA-11 ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE DA FRAÇÃO CC POR CROMATOGRAFIA DE GEL PERMEAÇÃO (BioGel P-30).....	80
FIGURA –12 ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DA FRAÇÃO CC.....	83
FIGURA-13 ESPECTRO DE RMN de $^{13}\text{C}$ DO EXTRATO C1S DE <i>C. crenulata</i> .....	86
FIGURA-14 ESPECTRO DE HMQC DA FRAÇÃO C1S DE <i>C. crenulata</i> .....	87
FIGURA-15 FRAÇÃO C2S-2a, OBTIDA ATRAVÉS DO REFRACIONAMENTO DE C2S-2.....	88
FIGURA-16 ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE DA FRAÇÃO C1S-3 POR CROMATOGRAFIA DE GEL PERMEAÇÃO (HPSEC-MALLS).....	91
FIGURA-17 ESPECTROS DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DAS GALACTANAS C1S-3(A) e C1S-3D (B).....	94

FIGURA-18 (A) ESTRUTURA DA MÍNIMA SEQÜÊNCIA DE LIGAÇÃO DO HEPARAN SULFATO. (B) MÍNIMA ESTRUTURA DE LIGAÇÃO DA AGARANA DE <i>A. spicifera</i> (Figura de DUARTE et al., 2004) .....	103
FIGURA-19 FOTO DA ALGA <i>C. seminervis</i> .....	109
FIGURA-20 ESPECTRO DE RMN* DE $^{13}\text{C}$ DA FRAÇÃO S1S DE <i>C. seminervis</i> .....	117
FIGURA-21 ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DA FRAÇÃO S2S DE <i>C. seminervis</i> .....	118
FIGURA-22 ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DA FRAÇÃO S3S DE <i>C. seminervis</i> .....	118
FIGURA-23 ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE DA FRAÇÃO S1S.....	119
FIGURA-24 ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE DA FRAÇÃO S2S.....	120
FIGURA-25 ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE DA FRAÇÃO S3S.....	120
FIGURA-26 ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE DA FRAÇÃO S2S-1.....	123
FIGURA-27 ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE DA FRAÇÃO S2S-2.....	123
FIGURA-28 ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE DA FRAÇÃO S2S-3.....	124
FIGURA-29 ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE DA FRAÇÃO S2S-4.....	124
FIGURA -30 ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DA FRAÇÃO S2S-3 DE <i>C. seminervis</i> .....	128
FIGURA-31 ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DAS FRAÇÕES S2S-3 E S2S-3D .....	130
FIGURA-32 ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DA FRAÇÃO S2S-3D DE <i>C. seminervis</i> .....	134
FIGURA-33 ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ DA FRAÇÃO S2S-3D DE <i>C. seminervis</i> .....	136
FIGURA-34 GRÁFICO DO TRATAMENTO ANALÍTICO DA GALACTANA S2S-3 DE <i>C. seminervis</i> .....	138
FIGURA-35 ESPECTRO DE RMN* DE $^{13}\text{C}$ DA FRAÇÃO S2S3-T DE <i>C. seminervis</i> .....	141

FIGURA-36 ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DA FRAÇÃO PARCIALMENTE DESPOLIMERIZADA CS.....	157
FIGURA -37 FOTO DA ALGA <i>H. floridana</i> .....	158
FIGURA-38 ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE DA FRAÇÃO HS.....	163
FIGURA-39 ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DA FRAÇÃO HS. ....	165
FIGURA-40 ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DA FRAÇÃO HS-D.....	168
FIGURA-41 DESLOCAMENTO QUÍMICO DO CARBONO 4 DAS UNIDADES DE 4,6-O-(1-carboxietilideno)- $\beta$ -D-galactopiranosose EM (A) QUANDO LIGADA A $\alpha$ -L-galactopiranosose E EM (B) QUANDO LIGADA A $\alpha$ -D-galactopiranosose (FALSHAW et al., 2003b).....	170

## LISTA DE TABELAS E ESQUEMAS

TABELA-1 CLASSIFICAÇÃO DAS CARRAGENANAS DE ACORDO COM ESTRUTURAS IDEAIS DE UNIDADES A E B.....	6
--	---

TABELA-2	CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DE GALACTANAS EXTRAÍDAS DE ESPÉCIES DA ORDEM HALYMENIALES.....	21
ESQUEMA-1	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO ENSAIO PARA DETERMINAÇÃO DO EFEITO DO PERÍODO DE INCUBAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS SOBRE O HSV-1.....	50
ESQUEMA-2	EXTRAÇÃO (A) E FRACIONAMENTO (B) DOS POLISSACARÍDEOS DE <i>C. crenulata</i> .....	53
TABELA-3	ANÁLISE QUÍMICA E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES C1, C2 E C3 DE <i>C. crenulata</i> .....	55
TABELA-4	ANÁLISE QUÍMICA E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO C2S, SOLÚVEL EM KCL 2M DE <i>C. crenulata</i> .....	56
TABELA-5	ANÁLISE QUÍMICA E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS SUB-FRAÇÕES DE C2S, DE <i>C. crenulata</i> .....	57
TABELA-6	ANÁLISE QUÍMICA E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA GALACTANA C2S-3, C2S-3D E C2S-3T DE <i>C. crenulata</i> .....	59
TABELA-7	ANÁLISE DE METILAÇÃO DAS GALACTANAS C2S-3, C2S-3D E C2S-3T.....	62
TABELA-8	TRIDEUTEROMETILAÇÃO DA GALACTANA NATIVA C2S-3 (N) E DA PARCIALMENTE DESSULFATADA (D).....	64
TABELA-9	SINAIS ANOMÉRICOS (ppm) PRESENTES NOS ESPECTRO DE RMN DE <sup>13</sup> C DAS FRAÇÕES C2S-3 E C2S-3D.....	68
TABELA -10	CONSTANTE DA VELOCIDADE E TEMPO DE MEIA VIDA DA REAÇÃO DE CICLIZAÇÃO ALCALINA DE ALGUMAS DÍADES DE CARRAGENANAS E AGARANAS.....	74
TABELA-11	ANÁLISE DO TEOR DE SULFATO E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO CC PROVENIENTE DA HIDRÓLISE REDUTIVA PARCIAL DA GALACTANA C2S-3 DE <i>C. crenulata</i> .....	80
TABELA-12	ANÁLISE DE METILAÇÃO DA GALACTANA C2S-3 E DA FRAÇÃO CC.....	82
TABELA-13	SINAIS ANOMÉRICOS (ppm) PRESENTES NOS	

ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DAS FRAÇÕES C2S-3 E CC.....	84
TABELA-14 RENDIMENTO E ANÁLISE QUÍMICA DAS FRAÇÕES DE <i>C. crenulata</i> .....	89
TABELA-15 COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO C1S E DE SUAS SUB-FRAÇÕES.....	90
TABELA-16 TEOR DE SULFATO E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA GALACTANA C1S-3, E C1S-3D DE <i>C. crenulata</i> .....	92
TABELA-17 SINAIS ANOMÉRICOS (ppm) PRESENTES NOS ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DAS FRAÇÕES C1S-3 E C1S-3D.....	95
TABELA-18 ANÁLISE DE METILAÇÃO DAS GALACTANAS C1S-3 E C1S-3D.....	97
TABELA-19 ATIVIDADE ANTI-HSV-1 E ENSAIO CITOTÓXICO DE GALACTANAS ISOLADAS DE <i>Cryptonemia crenulata</i> .....	100
TABELA-20 ATIVIDADE ANTI-HSV-1 E HSV-2 DE GALACTANAS ISOLADAS DE <i>Cryptonemia crenulata</i> .....	104
TABELA-21 INFLUENCIA DOS DIFERENTES PERIODOS DE TRATAMENTO NA ATIVIDADE DAS GALACTANAS DE <i>Cryptonemia crenulata</i> CONTRA HSV-1.....	105
TABELA-22 EFEITO DA FRAÇÃO C2 DE <i>Cryptonemia crenulata</i> NO TRATAMENTO DA INFECÇÃO VAGINAL COM HSV-2.....	107
ESQUEMA-3 Extração (A) e FRACIONAMENTO (B) DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DA ALGA <i>Cryptonemia seminervis</i> .....	110
TABELA-23 RENDIMENTO E ANÁLISE QUÍMICA DAS FRAÇÕES DE <i>C. seminervis</i> OBTIDAS POR EXTRAÇÃO AQUOSA À TEMPERATURA DE 25°C E 80°C.....	112
TABELA-24 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES S1, S2 E S3 DA ALGA <i>C. seminervis</i> .....	113
TABELA 25- RENDIMENTO E ANÁLISE QUÍMICA DAS FRAÇÕES DE <i>C.</i>	114



<i>seminervis</i> , OBTIDAS APÓS TRATAMENTO COM KCl .....	
TABELA-26 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES DE <i>C. cseminervis</i> SOLÚVEIS EM KCl 2 M.....	116
27 RENDIMENTO E ANÁLISE QUÍMICA DAS FRAÇÕES DE <i>C. seminervis</i> , OBTIDAS POR CROMATOGRAFIA DE TROCA-IÔNICA (DEAE-Sephacel) DE S2S.....	
28 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS SUBFRAÇÕES DE <i>C. seminervis</i> OBTIDAS POR CROMATOGRAFIA DE TROCA-IÔNICA (DEAE-Sephacel) DE S2S.....	!
29 COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA E ANÁLISE ENANTIOMÉRICA DA FRAÇÃO S2S-3) DE <i>C. seminervis</i> .....	;
TABELA-30 SINAIS ANOMÉRICOS (ppm) PRESENTES NOS ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DA FRAÇÃO S2S-3.....	)
31 COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES NATIVA (S2S-3) E DESSULFATADA (S2S-3D) DE <i>C. seminervis</i> .....	
TABELA-32 SINAIS ANOMÉRICOS (ppm) PRESENTES NOS ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DA FRAÇÃO S2S-3D.....	133
33 COMPARAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO S2S-3 DE <i>C. seminervis</i> ANTES E APÓS TRATAMENTO ALCALINO.....	)
TABELA-34 SINAIS ANOMÉRICOS (ppm) PRESENTES NOS ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DA FRAÇÃO S2S-3T.....	140
TABELA-35 RESULTADOS DAS ANÁLISES DE METILAÇÃO DAS FRAÇÕES S2S-3, S2S-3D e S2S-3T.....	144
TABELA-36 TRIDEUTEROMETILAÇÃO DA GALACTANA NATIVA S2S-3 (N) E DA PARCIALMENTE DESSULFATADA S2S-3D (D).....	150
TABELA-37 ANÁLISE DO TEOR DE SULFATO E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO CS PROVENIENTE DA HIDRÓLISE REDUTIVA PARCIAL DA GALACTANA S2S-3 DE <i>C. seminervis</i> .....	152

TABELA-38 ANÁLISE DE METILAÇÃO DA GALACTANA S2S-3 E DA FRAÇÃO CS.....	153
TABELA-39 DESLOCAMENTOS QUÍMICOS (ppm) DE DÍADES ENCONTRADAS NO ESPECTRO DE RMN DE <sup>13</sup> C DA FRAÇÃO CS.....	156
ESQUEMA-4 EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DA ALGA <i>Halymenia floridana</i> .....	159
TABELA-40 RENDIMENTO E ANÁLISE QUÍMICA DA FRAÇÃO DE <i>H. floridana</i> OBTIDA POR EXTRAÇÃO AQUOSA A 80 °C.....	160
TABELA-41 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO H DE <i>H. floridana</i> OBTIDA POR EXTRAÇÃO AQUOSA A 80 °C.	161
TABELA-42 RENDIMENTO E ANÁLISE QUÍMICA DAS FRAÇÕES TRATADAS COM KCl DE <i>H. floridana</i> .....	162
TABELA-43 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES HS E HP DE <i>H. floridana</i> OBTIDAS POR TRATAMENTO COM KCl. ....	163
TABELA-44 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES HS E HS-D DE <i>H. floridana</i> .....	167
TABELA-45 SINAIS ANOMÉRICOS (ppm) PRESENTES NOS ESPECTRO DE RMN DE <sup>13</sup> C DA FRAÇÃO HS-D.....	171
TABELA-46 ANÁLISE QUÍMICA E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS GALACTANAS C2S-3, S2S-3 E HS.....	172
TABELA-47 COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS GALACTANAS C2S-3, S2S-3 E HS.....	173

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

$\alpha_D$  – rotação óptica específica (a 20 ° C)

<sup>13</sup>C - carbono 13

**$^1\text{H}$**  - próton

**4-MMB** – 4-metil-morfolina borano

**$A_{\infty}$**  - absorbância a tempo infinito

**$A_0$**  - absorbância a tempo inicial (zero minuto)

**$A_t$**  - absorbância a tempo t

**$\text{BaCl}_2$**  – cloreto de bário

**CLG** – cromatografia líquido-gasosa

**CG-EM** – cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa

**$\text{D}_2\text{O}$**  – água deuterada

**DEAE** - dietilaminoetil

**DMSO** – DIMETIL SULFÓXIDO

**FT-IR** – espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier.

**HCl** – ácido clorídrico

**HMQC** - heteronuclear multiple quantum correlation spectroscopy

**HPSEC-MALLS** - cromatografia de exclusão estérica de alta pressão (hpsec) acoplada a detector de índice de refração diferencial e espalhamento de luz em multiângulos (malls)

**Hz** - hertz

**$\text{ICH}_3$**  – iodometano

**$\text{ICD}_3$**  – iodometano deuterado

**k** - velocidade da reação

**KBr** – brometo de potássio

**KCl** – cloreto de potássio

**MHz** – mega hertz

**$\text{NaBD}_4$**  – borodeutereto de sódio

**$\text{NaBH}_4$**  – borohidreto de sódio

**$\text{NaCl}$**  – cloreto de sódio

**$\text{NaNO}_3$**  – nitrito de sódio

**$\text{NaOH}$**  – hidróxido de sódio

**p/v** – peso/volume

**ppm** – partes por milhão

**RMN** – Ressonância Magnética Nuclear

**t<sub>1/2</sub>** – tempo de meia-vida

**TFA** – ácido trifluoroacético

**HS** – heparan sulfato

**PFU** – unidades formadoras de placas

**CC<sub>50</sub>** – concentração citotóxica 50%

**IC<sub>50</sub>** – concentração inibitória 50%

**SI** – índice de seletividade ou CC<sub>50</sub>/IC<sub>50</sub>

**VC<sub>50</sub>** – concentração virucida, ou concentração necessária para inativar os vírus em 50%

## RESUMO

As galactanas homogêneas C1S-3 ( $M_w = 315.000$ ) e C2S-3 ( $M_w = 236.200$ ), S2S-3 ( $M_w = 414.900$ ) e HS foram obtidas por extração aquosa e posterior purificação das algas vermelhas *Cryptonemia crenulata*, *Cryptonemia seminervis* e *Halymenia floridana* (Halymeniales, Rhodophyta), respectivamente. Estas galactanas são sulfatadas (16,0%, 28,3%, 27,25 e 30,3%, respectivamente) e piruvatadas (0,7%, 0,5%, 5,1% e 4,5%, respectivamente). As unidades A ( $\beta$ -galactose-3-O-substituída) em C2S-3 (91%), S2S-3 (77%) e HS são majoritariamente sulfatadas em C-2, enquanto em C1S-3 são principalmente não substituídas. Unidades de 4,6-O-(1'-carboxietilideno)- $\beta$ -D-galactopiranoose são também sulfatadas em C-2 (C2S-3 e S2S-3). As unidades B ( $\alpha$ -galactose-4-O-substituída) são mais heterogêneas quando comparada as unidades A. Em C1S-3 são constituídas por 2-O-metil-galactose, baixas porcentagens de unidades precursoras de 3,6-anidrogallactose ( $\alpha$ -galactose 6-sulfato) e por unidades de 3,6-anidrogallactose não substituídas ou metiladas em C-2 (13,9 mol%). Em C2S-3 são encontradas na forma de 3,6-anidro-2-O-metil- $\alpha$ -L-galactose (8,6 mol%), 3,6-anidro- $\alpha$ -galactose 2-sulfato (2 mol% da série D-, e 11,6 mol% L-) e 3,6-anidrogallactose (3,5 mol%). Unidades precursoras (10,9 mol%), são principalmente da série D- (7,6 mol%), assim como 2-O-metil-galactose (3,2 mol% D- e 1,3 mol% L-). De modo diferente na galactana S2S-3 as unidades anidrogallactosídicas (20,2 mol%) são pertencentes a série enantiomérica L- (32% destas são não substituídas, 13% são sulfatadas e 9,5% são metiladas em C-2), bem como  $\alpha$ -galactose 6-sulfato (6,9 mol%). Unidades de 2-O-metil- $\alpha$ -galactose (4,0 mol%) são principalmente da série D- (2,5 mol%). Na galactana HS,  $\alpha$ -D- e  $\alpha$ -L-galactose e 3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactose estão presentes. Deste modo unidades B pertencentes tanto a série enantiomérica D- como L-, caracteriza estas galactanas como do tipo DL-híbridas. C2S-3 apresenta 55% da sua estrutura com característica de agarana (45% de carragenana), enquanto em S2S-3 70% da sua estrutura é de agarana (30% de carragenana). Caráter DL-híbrido também foi confirmado nos produtos de despolimerização ácida parcial das galactanas C2S-3 e S2S-3. C2S-3 e S2S-3 foram submetidas ao estudo da cinética de ciclização alcalina a 80 °C e apresentaram uma constante de velocidade da reação (k) de  $1,7 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$  e  $5,7 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ , e um tempo de meia vida de 68,6 e 20,2 minutos, respectivamente. C2S-3 apresentou uma reação intermediária entre uma  $\lambda$ -carragenana e uma porfirana, enquanto que para S2S-3 a reação é similar a uma porfirana. Estes resultados demonstram que em C2S-3 há unidades precursoras ligadas a  $\beta$ -galactose 2-sulfato, enquanto que em S2S-3 as unidades precursoras estão ligadas a  $\beta$ -galactose. A potente atividade antiviral de C2S-3 e de outras frações brutas de *C. crenulata*, frente a diferentes cepas de HSV-1 e HSV-2, inibindo a etapa de adsorção viral, foi atribuída principalmente a presença das díades  $\beta$ -D-galactose 2-sulfato ligada a  $\alpha$ -galactose 6-sulfato. Esta díade é estruturalmente análoga a mínima seqüência do heparan sulfato necessária para a interação deste com a glicoproteína gC do envelope viral do HSV-1. Em resumo as galactanas das algas da ordem Halymeniales investigadas no presente trabalho são do tipo DL-híbrida com díades diferentes das carragenanas ou agaranas classicamente descritas na literatura.

## ABSTRACT

The homogeneous galactans C1S-3 ( $M_w = 315,000$ ) and C2S-3 ( $M_w = 236,200$ ), S2S-3 ( $M_w = 414,900$ ) and HS were obtained after aqueous extractions from the red seaweeds (Halymeniales, Rhodophyta) *Cryptonemia crenulata*, *Cryptonemia seminervis* and *Halymenia floridana* respectively. These were shown to be sulfated (16.0%, 28.3%, 27.25 and 30.3%) and piruvated (0.7%, 0.5%, 5.1% and 4.5%). Sulfate was found mainly at C-2 of the A units (3-linked  $\beta$ -D-galactopyranosyl) of C2S-3 (91%), S2S-3 (77%) and HS, while C1S-3 was found mainly unsubstituted. The 4,6-O-(1'-carboxyethylidene)- $\beta$ -D-galactopyranose units were sulfated at C-2 (C2S-3 and S2S-3). The B units (4-linked  $\alpha$ -galactopyranosyl residues) of these galactans were more heterogeneous when compared to the A units. In C1S-3, these contained 2-O-methyl-galactose, low percentages of precursor units of 3,6-anhydrogalactose ( $\alpha$ -galactose 6-sulfate), and 3,6-anhydrogalactose units (13.9 mol%), which may be found methylated at C-2. In C2S-3, these units were 3,6-anhydro-2-O-methyl-L-galactose (8.6 mol%), 3,6-anhydro-L-galactose 2-sulfate (2 mol% D-, and 11.6 mol% L-), 3,6-anhydrogalactose (3.5 mol%). Precursor units (10.9 mol%) were major to D- form (7.6 mol%) and 2-O-methyl-galactose (3.2 mol% D- and 1.3 mol% L-). The S2S-3 fraction had B units composed of 3,6-anhydrogalactose (20.2 mol%) belonging to serie L- (32% of which were non-substituted, 13% sulfated at C-2 and 9.5% methylated at C-2). As well as  $\alpha$ -L-galactose 6-sulfate (6.9 mol%). The 2-O-methyl- $\alpha$ -galactose were mostly to D- form (2.5 mol%). In the HS galactan,  $\alpha$ -D- and  $\alpha$ -L-galactose and 3,6-anhydro- $\alpha$ -L-galactose were present. The presence of D- and L- enantiomers forming the B units characterized these galactans as being DL-hybrid type. The structure of C2S-3 is 55% characteristic of agaran (45% is carrageenan-like), while in S2S-3, 70% of the molecule had agaran characteristics (30% of carrageenans). The DL-hybrid character was also confirmed in the products of partial depolymerization of C2S-3 and S2S-3. C2S-3 and S2S-3 were submitted to alkaline cyclization at 80 °C and its kinetic determined. The rate constant (k) found was  $1.7 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$  and  $5.7 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$  with half-lives of 68.6 and 20.2 minutes, respectively. C2S-3 had an intermediary reaction between those of porphyrans and  $\lambda$ -carrageenans, and S2S-3 the reaction was porphyran-like. These results show that the precursor units in C2S-3 are linked to  $\beta$ -galactose 2-sulfate units, while precursors of S2S-3 are linked to unsubstituted residues. The antiviral activity of C2S-3 and other crude fractions of *C. crenulata* against a broad variety of strains of HSV-1 and HSV-2, inhibiting the viral adsorption was due to the presence of the diads of  $\beta$ -D-galactose 2-sulfate linked to  $\alpha$ -galactose 6-sulfate. This diad is structurally similar to the minimal sequence of the heparan sulfate for the interaction with glycoprotein C (gC) of HSV-1. Summarizing, the galactans biosynthesized by algae of the order Halymeniales investigated at present work are belong to the DL-hybrid type, with different diads of the classical carrageenans or agarans presents in the literature.

# 1- INTRODUÇÃO

## 1.1- ALGAS VERMELHAS

As algas vermelhas (Rhodophyta) são as principais macrófitas marinhas, representando 27% de todas as espécies de plantas marinhas descritas. (PAINTER, 1983; USOV, 1992). São encontradas amplamente distribuídas ao longo da costa brasileira, porém os costões e fundos rochosos, bem como as áreas recifais, são as mais ricas em macroalgas, tanto em diversidade quanto em biomassa.

As algas vermelhas vêm sendo utilizadas pelo homem desde muitos anos em uma ampla variedade de produtos alimentícios, farmacológicos e industriais, bem como para fins biotecnológicos (LOBBAN; HARRISON, 1994). A composição polissacarídica das algas vermelhas é muito diferente das de outras plantas, e contém usualmente galactanas sulfatadas como o principal constituinte estrutural da parede celular na matriz intercelular (PAINTER, 1983).

Segundo KLOAREG e QUATRANO (1988) os polissacarídeos da matriz das algas marinhas estão correlacionadas com a regulação osmótica ou iônica, adaptando as algas ao meio marinho. Ainda com função de osmorregulação, as algas biossintetizam carboidratos de baixo peso molecular e/ou polióis (KARSTEN et al., 1993).

Como polissacarídeo de reserva as algas vermelhas contem um polímero constituído por  $\alpha$ -D-glucose, denominado “amido das florídeas”, com ligações glicosídicas do tipo  $\alpha$ -(1→4) e pontos de ramificação no carbono-6 similar à amilopectina (PAINTER, 1983), porém possui uma proporção maior de ramificações assemelhando-se ao glicogênio animal, e desta forma também apresenta uma coloração azul quando ensaiado com lugol.

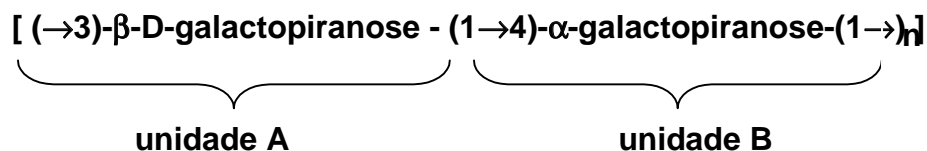
Algumas galactanas sulfatadas apresentam propriedades geleificantes e estabilizantes; estas são muito exploradas comercialmente devido a sua larga aplicação industrial. Vários outros polissacarídeos não têm propriedades de interesse

industrial, mas são muito promissores como compostos biologicamente ativos, como por exemplo, atividade antiviral (CARLUCCI et al., 1999; DUARTE et al., 2001, 2004; TALARICO et al., 2004), antitumoral (FERNÁNDEZ, et al., 1989) e antitrombótica (SEN et al., 2002). Além do interesse industrial, a determinação da estrutura química destes polissacarídeos pode também ser utilizada para elucidar a posição taxonômica das algas vermelhas, suplementando os critérios clássicos, como: morfologia, anatomia e ciclo de vida das algas (USOV, 1998).

## 1.2- GALACTANAS: ESTRUTURA GERAL

A importância de se estudar a estrutura química das galactanas isoladas de rodófitas, está em se correlacionar detalhes estruturais com propriedades físico-químicas ou atividade biológica apresentadas pelas mesmas (USOV, 1998).

Estruturalmente, as galactanas consistem de cadeias lineares de unidades de  $\beta$ -D-galactopiranoose ligados glicosidicamente através da posição 3 (unidade A) e  $\alpha$ -galactopiranoose ligados glicosidicamente através da posição 4 (unidade B) (PERCIVAL; McDOWELL, 1967). Deste modo formam um arranjo alternado entre as unidades A e B  $(AB)_n$ .





Embora sua estrutura básica seja repetitiva, as galactanas apresentam grande diversidade estrutural, devido aos diferentes tipos de substituintes na cadeia principal, como por exemplo:

- A unidade A pode apresentar grupos éter metílico no carbono-6; grupos éster sulfato em carbono 2, 4 ou 6, ou ainda podem apresentar substituição por acetal de ácido pirúvico.

- A unidade B pode apresentar grupos sulfato ou éter metílico nos carbonos 2, 3 ou 6 ou estar totalmente ciclizada na forma de 3,6-anidrogactose. O anidro-açúcar pode apresentar seu carbono 2 substituído por sulfato ou éter metílico (PAINTER, 1983).

Estes substituintes, de diferentes tipos em diferentes posições originam moléculas de estruturas complexas.

#### **1.4- GALACTANAS: CLASSIFICAÇÃO**

As galactanas podem ser divididas em grupos conforme a configuração enantiomérica das unidades B ( $\alpha$ -galactose). Estas unidades podem ser pertencentes a série L-, D- ou L- e D- caracterizando o grupo das agaranas, das carragenanas e das galactanas do tipo DL-híbrida, respectivamente.

Para facilitar e homogeneizar a escrita das unidades dissacarídicas repetitivas das galactanas (díades), KNUTSEN et al. (1994) desenvolveram uma nomenclatura simbólica, na qual as unidades A ( $\beta$ -galactopiranosose) são simbolizadas pela letra G, e as unidades B quando pertencentes ao grupo das carragenanas são simbolizadas pela letra D ( $\alpha$ -D-galactopiranosose) e DA (3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactose), já as unidades B pertencentes ao grupo das agaranas são simbolizadas pela letra L ( $\alpha$ -L-galactopiranosose) e LA (3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactose). As substituições por grupos metil, sulfato e xilose recebem um número correspondente ao carbono que está sendo substituído e as letras correspondentes ao tipo de substituinte M, S e X,

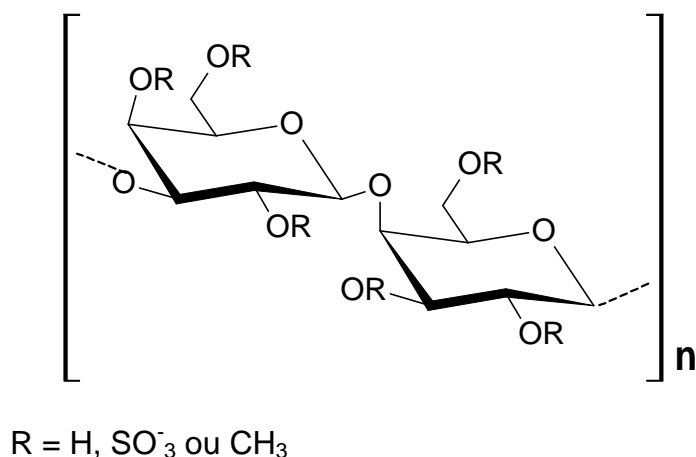
respectivamente. Acetal de ácido pirúvico substituindo as unidades A são representados simbolicamente de GP.

No presente trabalho foi adotada a nomenclatura desenvolvida por KNUTSEN et al. (1994) para designar as unidades dissacarídicas encontradas nas galactanas estudadas.

### 1.3.1- GALACTANAS DO TIPO CARRAGENANAS

As carragenanas são constituídas de unidades alternantes de (1→3)-β-D-galactopirranose (unidade A) e (1→4)-α-D-galactopirranose (unidade B), sendo, portanto a estereoquímica da unidade B pertencente à série D- (Figura-1). Esta última unidade pode ser encontrada na forma totalmente ciclizada de 3,6-anidro-α-D-galactose, ou ainda na sua forma precursora de anidro-açúcar α-D-galactose 6-sulfato. Geralmente as carragenanas apresentam uma alta porcentagem de grupos sulfato e uma baixa porcentagem de grupos O-metil naturais (PAINTER, 1983).

**FIGURA-1 ESTRUTURA BÁSICA REPETITIVA DE CARRAGENANAS, (UNIDADES D-ALTERNANTES).**



As carragenanas são tradicionalmente classificadas em 4 famílias, as quais levam um prefixo de uma letra do alfabeto grego, de acordo com a posição dos grupos sulfato nas unidades A e B e ciclização da unidade B (Tabela –1).

I - A família *Kappa* ( $\kappa$ ), apresenta grupos sulfato no carbono-4 da unidade A.

II - A família *Lambda* ( $\lambda$ ), com grupos sulfato no carbono-2 de ambas unidades.

III - A família *Beta* ( $\beta$ ) compreende polissacarídeos em que a unidade A não é sulfatada.

IV - A família *Ômega* ( $\omega$ ), compreende galactanas que apresentam grupos sulfato no carbono 6 da unidade A.

A classificação apresentada na Tabela-1 corresponde a carragenanas com estruturas ideais, ou seja, formadas apenas por um dos tipos de unidades dissacarídicas repetitivas (díades ideais).

Ressalta-se, no entanto que na natureza as carragenanas podem conter um ou mais tipo de unidades repetitivas caracterizando o que denomina-se de carragenanas híbridas. Nestas por exemplo, podem ser observadas em uma mesma molécula estruturas repetitivas de *kappa*- e *iota*-carragenanas, em diferentes proporções (carragenana híbrida *kappa/iota*).

Além da presença de diferentes tipos de “díades ideais” em uma mesma molécula, as carragenanas podem adicionalmente, ser constituídas por “díades desviantes”, como exemplo as carragenanas altamente metiladas (6-O-metil- $\beta$ -D-galactose) em espécies do gênero *Rhabdonia* (17-31%) (CHIOVITTI et al., 1996) e do gênero *Clavicornium* (45%) (CHIOVITTI et al., 2004).

Embora substituições por grupos O-metil ou acetal de ácido pirúvico sejam mais freqüentes em galactanas do tipo agarana, as carragenanas de algas do gênero *Callophycus* (Gigartinales, Rhodophyta) apresentam alto teor de piruvatação (43-49%). É importante ressaltar, que a presença de acetal de ácido pirúvico foi relatada pela primeira vez em galactanas do tipo agarana por HIRASE (1957).

**TABELA-1 CLASSIFICAÇÃO DAS CARRAGENANAS DE ACORDO COM ESTRUTURAS IDEAIS DE UNIDADES A E B.**

Família	(→3)-β-D-Galp – (1→4) -α-D-Galp -(1→)	Nomenclatura de
	(Unidade A)	KNUTSEN et al. (1994)
KAPPA		
κ (kappa)	4-sulfato – 3,6-anidrogalactose	G4S – DA
ι (iota)	4-sulfato – 3,6-anidrogalactose 2-sulfato	G4S – DA2S
μ (mu)	4-sulfato – 6-sulfato	G4S – D6S
ν (nu)	4-sulfato – 2,6-dissulfato	G4S – D2,6S
LAMBDA		
λ (lambda)	2-sulfato – 2,6-dissulfato	G2S – D2,6S
ξ (xi)	2-sulfato – 2-sulfato	G2S – D2S
π (pi)	2-sulfato; 4,6-O-(1'-carboxietilideno) – 2-sulfato	GP,2S – D2S
θ (theta)	2-sulfato – 3,6-anidrogalactose 2-sulfato	G2S – DA2S
OMEGA		
ω (omega)	6-sulfato – 3,6-anidrogalactose	G6S – DA
ψ (psi)	6-sulfato – 6-sulfato	G6S – D6S
BETA		
β (beta)	não-sulfatada – 3,6-anidrogalactose	G – DA
α (alpha)	não sulfatada – 3,6-anidrogalactose 2-sulfato	G – DA2S
γ (gamma)	não sulfatada – 6-sulfato	G – D6S
δ (delta)	não sulfatada – 2,6-dissulfato	G – D2,6S

As variações quanto ao tipo de carragenanas não ocorrem somente entre diferentes espécies de algas, mais também em diferentes estágios de vida de uma mesma espécie (FALSHAW et al., 2003a). O histórico de vida das Rhodophytas é geralmente trifásico, composto por fases gametofíticas (haplóide), carposporofítica

(diplóide) e tetrasporofítica (diplóide), o que caracteriza um histórico de vida do tipo *Polysiphonia*. Nas famílias Gigartinaceae e Phyllophoraceae da ordem Gigartinales, as algas na fase gametofítica (n) produzem carragenanas da família *kappa*, enquanto que os esporofitos (2n) biossintetizam carragenanas da família *lambda* (McCANDLESS et al., 1982).

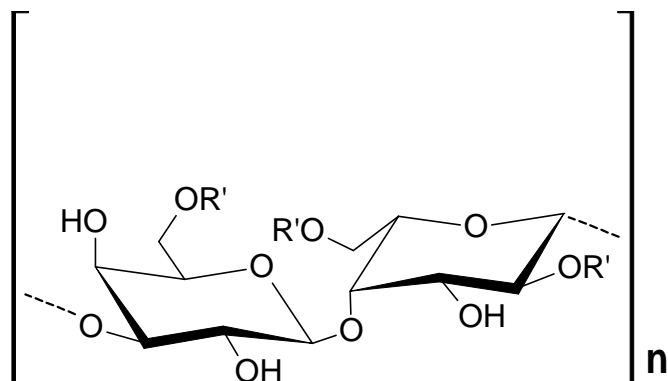
Nesse aspecto pode-se citar a espécie *Gigartina skottsbergii*, onde as plantas gametofíticas biossintetizam similares quantidades de *kappa/iota* e *mu/nu*-carragenanas (precursores da *kappa*- e *iota*-carragenana, respectivamente), enquanto as plantas tetrasporofíticas sintetizam somente *lambda*-carragenana (NOSEDA, 1994).

### 1.3.2- GALACTANAS DO TIPO AGARANAS

Este tipo de galactana apresenta a cadeia principal formada por unidades de  $(1\rightarrow3)\text{-}\beta\text{-D-Galp}$  e  $(1\rightarrow4)\text{-}\alpha\text{-L-Galp}$ , portanto diferindo das carragenanas na estereoquímica da unidade B. Assim como nas carragenanas esta unidade pode estar na correspondente forma do seu derivado 3,6-anidrogactose (PAINTER, 1983) (Figura-2).

Nos primeiros estudos de fracionamento de agaranas ARAKI (1956) considerou que esta classe era composta por 2 componentes: agarose, que consiste de uma estrutura ideal repetitiva de  $[\rightarrow3)\beta\text{-D-galactose}(1\rightarrow4)\alpha\text{-L-3,6-anidrogactose}(1\rightarrow]$ , e agarpectina que possui uma estrutura mais complexa contendo grupos substituintes ácidos como: sulfato e piruvato.

**FIGURA-2 ESTRUTURA BÁSICA REPETITIVA DE AGARANAS, (UNIDADES D- E L- ALTERNANTES).**



$R' = H, CH_3 \text{ ou } SO_3^-$

A classificação das agaranas não é bem definida como das carragenanas, no entanto algumas sistematizações foram elaboradas, em 1971, por DUCKWORTH e YAPHE, consideraram que as agaranas compreendem 3 tipos extremos de estrutura:

I - Agarose neutra possui estrutura linear e regular constituída por unidades alternadas de D-galactose (unidade A) e 3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactose (unidade B) (ARAKI; HIRASE, 1960);

II - Agarose piruvatada, apresenta baixo grau de sulfatação, e ainda possui unidades de  $\beta$ -D-galactose substituídas por acetal de ácido pirúvico [4,6-O-(1'-carboxietilideno)].

III - Galactanas sulfatadas apresentam um aumento no grau de sulfatação da unidade B, baixa porcentagem de 3,6-anidrogallactose e de acetal de ácido pirúvico.

A agarose (unidades alternadas de D-galactose e 3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactose, G – LA, na nomenclatura de KNUTSEN et al., 1994) é a agarana de maior valor comercial com alta propriedade de geleificação. A presença de grupo substituinte nesta díade,

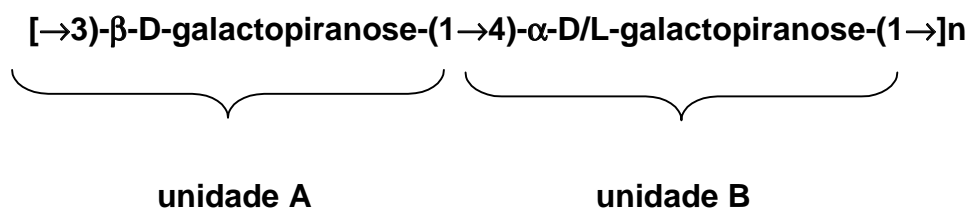
como grupos sulfato, modifica as propriedades das agaranas diminuindo o poder de geleificação e assim diminuindo o valor comercial deste ficocolóide.

Embora algumas agaranas com estrutura clássica repetitiva, como no caso da agarose, sejam naturalmente obtidas, a maioria das espécies biossintetizam agaranas com uma grande dispersão estrutural. Portanto esta classificação é desatualizada.

Porfirana é o nome genérico, freqüentemente utilizado na literatura para designar as agaranas sulfatadas biossintetizadas por algas dos gêneros *Porphyra* e *Bangia* (ASPINALL, 1970). Estas apresentam grupos O-metil em C-6 das unidades A, e parte das unidades B se encontram sulfatadas em C-6 (NOSEDA et al., 2000).

### 1.3.3- GALACTANAS DO TIPO DL-HÍBRIDA

Além das carragenanas e agaranas, algumas ordens da divisão Rhodophyta, como por exemplo, na ordem Halymeniales, biossintetizam galactanas com uma estrutura entre agarana e carragenana, onde em uma mesma molécula estão presentes estruturas típicas de carragenanas e de agaranas (KNUTSEN et al., 1994). Este tipo estrutural foi denominado de carrágar por CHOPIN et al. (1999) e recentemente STORTZ e CEREZO (2000) adotaram o termo galactana do tipo DL-híbrida, para diferenciar do termo híbrido adotado para as carragenanas.



Esta classe de galactanas começou a ser relatada com maior freqüência na década de 90, e até o presente momento vem se descobrindo um maior número de espécies que biossintetizam este tipo de galactana, possivelmente devido aos avanços nas metodologias utilizadas para a análise estrutural de polissacarídeos.

As galactanas do tipo DL-híbridas podem ser divididas de acordo com a proporção de unidades B pertencentes a série enantiomérica L-, em: DL-Híbrida com um predomínio da estrutura de carragenana e DL-Híbrida com um predomínio da estrutura de agarana.

Com o aparecimento desta classe de galactanas, e com os relatos da presença de mais de um tipo de galactana biossintetizado por uma mesma espécie, algumas denominações precisam ser reavaliadas. Uma denominação muito utilizada é o termo carragenófito, adotado para várias famílias da ordem Gigartinales, e agarófitas adotado para famílias das ordens Gracilariales e Gelidiales, pois se referem a algas produtoras apenas de carragenanas e agaranas, respectivamente. Algas da ordem Gigartinales, denominadas classicamente de carragenófitas, também biossintetizam pequenas quantidades de galactanas contendo L-galactose (CIANCIA et al., 1993; STORTZ et al., 1997). Tem sido recentemente relatado a presença de galactanas do tipo DL-híbridas em espécies pertencentes à ordem Ceramiales (TAKANO et al., 1999; TAKANO et al., 2003), classicamente denominadas de agarófitas. Desta forma os termos carragenófitas e agarófitas poderiam ser adotados para indicar o principal polímero biossintetizado pelas algas vermelhas.

Provavelmente novas pesquisas estruturais de galactanas, com um fracionamento minucioso, e determinação das unidades enantioméricas, levará ao reconhecimento de um maior número de galactanas do tipo DL-híbrida, ou mesmo de algas produtoras de espécies que sintetizam tanto agaranas quanto carragenanas. Este fato pode também ser aplicado para a re-análise das espécies utilizadas comercialmente como fonte de agaranas ou carragenanas (STORTZ; CERESO, 2000).



## 1.4- ALGAS PRODUTORAS DE CARRAGENANAS

### 1.4.1- ORDEM GIGARTINALES

Na divisão Rhodophyta a ordem Gigartinales é a mais numerosa, sendo formada por 41 famílias, 100 gêneros e 700 espécies (CHOPIN et al., 1999).

Algas desta ordem são conhecidas como típicas produtoras de carragenanas, sendo algumas exploradas comercialmente como as do gênero: *Gigartina*, *Eucheuma* e *Hypnea*.

Como já mencionado anteriormente, algumas famílias da ordem Gigartinales (Phyllophoreaceae, Gigartinaceae e Petrocilidaceae) produzem diferentes tipos de polissacarídeos de acordo com os seus estágios de vida. As gametofíticas (n) produzem carragenanas da família *kappa*, enquanto que as esporofíticas (2n) biossintetizam carragenanas da família *lambda* (McCANDLESS et al., 1982). Estas famílias Phyllophoreaceae, Gigartinaceae e Petrocilidaceae da ordem Gigartinales fazem parte de um mesmo grupo dentro desta ordem.

Em outras famílias da ordem Gigartinales, como na Solieriaceae não há uma característica estrutural dos seus biopolímeros de acordo com a fase do histórico de vida da alga, formando assim um segundo grupo dentro da ordem Gigartinales. No gênero *Eucheuma* (família Solieriaceae), tanto a fase tetrasporofítica quanto a cistocárpica, biossintetizam carragenanas da família *kappa* (DOTY; SANTOS, 1978).

Ainda nesta família as diferentes fases do histórico de vida da espécie *Kappaphycus alvarezii* (antes conhecida como *Eucheuma cottonii*), também produzem *kappa*-carragenana. Esta espécie é cultivada em larga escala nas Filipinas, para extração industrial de *kappa*-carragenana, e no Brasil está sendo introduzida no litoral paulista (Ubatuba) e tem mostrado um crescimento promissor para cultivo comercial (DE PAULA et al., 2002).

De acordo com STORTZ e CEREZO (2000), um terceiro grupo estaria composto pelas famílias pertencentes à antiga ordem Cryptonemiales e agora

incluídas na ordem Gigartinales (Tichocarpaceae, Endocladiaceae, Kallymenaceae e Dumontiaceae).

Na família Endocladiaceae, WHYTE et al. (1984), estudando a alga *Endocladia muricata*, identificaram um polissacarídeo, que após metanólise e análise por HPLC, era constituído principalmente por carrabiose [ $\beta$ -D-galactose-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactose], mas também com 6% de agarobiose [ $\beta$ -D-galactose-(1 $\rightarrow$ 4)-3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactose]. Nesta mesma família, algas do gênero *Gloiopeltis*, têm sido classificadas como agarófitas, devido à caracterização dos seus polissacarídeos como agarana sulfatada, como por exemplo, em *G. cervicornis* (PENMAN; REES, 1978).

No entanto, na espécie *G. furcata*, TAKANO et al. (1998), caracterizaram um polissacarídeo com rotação óptica positiva e que por hidrólise parcial, originou oligossacarídeos com estrutura de carragenana, e outros com estrutura de agaranas.

De modo similar, de *G. complanata* TAKANO et al. (1995) isolaram um polissacarídeo com estrutura híbrida de carragenana e agarana. Já as espécies *G. coliformis* e *G. tenax*, são produtoras de carragenanas (CHOPIN et al., 1999). Estes estudos exemplificam a grande diversidade de tipos de galactanas sintetizadas por algas de um mesmo gênero.

De modo semelhante algas da família Kallymeniaceae, biossintetizam diferentes tipos de galactanas, como: agaranas, carragenanas e do tipo DL-híbrida (CHOPIN et al., 1999).

A galactana de *K. berggrenii* (MILLER; FURNEAUX, 1996) apresenta na sua unidade B, D- e L-galactose em uma relação de 3:1, e relativamente altas porcentagens de 3,6-anidrogallactose e seu derivado 2-O-metilado. Estes polissacarídeos apresentam ainda, galactose, 2-O-metilgalactose, 6-O-metilgalactose, xilose e acetal de ácido pirúvico (sinal de 25,0 ppm, no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , referente ao grupo metil de acetal de ácido pirúvico). O padrão de sulfatação, determinado por análise de metilação do polímero antes e após dessulfatação, demonstrou a presença de galactose 2- e 6-sulfato nas unidades A, bem como nas unidades B. Adicionalmente, parte das unidades B estão na forma de 3,6-anidrogallactose 2-sulfato. O padrão de sulfatação desta galactana, não foi

completamente esclarecido, desde que foi ainda observado a presença dos derivados 6-O- e 2,6-di-O-metilgalactose entre os produtos de metilação do polímero nativo. Estes podem corresponder à galactose 2,4- e/ou 2,3- sulfato, e a galactose 4- e/ou 3- sulfato, respectivamente. Algas do gênero *Kallymenia* (*K. reniformis* e *K. westii*) (DESLANDES et al., 1990) (CHOPIN et al., 1994) sintetizam galactanas denominadas genericamente de aeodanas. As aeodanas apresentam uma estrutura majoritária de carragenana, porém com uma pequena porcentagem de  $\alpha$ -L-galactose, grupos sulfato apenas nas unidades A, principalmente em C-2 e C-4, e grupos metoxil geralmente localizados em C-6 das unidades A e em C-2 das unidades B (USOV et al., 1980).

USOV e KLOCHKOVA (1992), por meio de um *screening* de cinco espécies da família Kallymeniaceae, analisando os rendimentos de carrabiose e/ou agarobiose, classificaram as algas *Beringia castanea* e a *Velatocarpus pustulosus* como agarófitas, *Callophyllis rhynchocarpa* como carragenófitas e *Callophyllis cristata* e a *Cirrulicarpus gmelini* como produtoras de galactanas do tipo DL-híbrida.

Foi constatado por CHOPIN et al. (1999), por meio da análise do espectro de infravermelho que as espécies: *Constantinea rosa-marina*, *C. subulifera*, *Cryptosiphonia woodii*, *Neodilsea borealis*, *N. natashae* e *N. yendoana* pertencentes à família Dumontiaceae, apresentavam no seu espectro bandas de absorção características de agarana e de carragenana; deste modo os autores classificaram estas espécies como produtoras de galactanas do tipo DL-híbrida. É importante ressaltar que a forma de análise não levou em conta a homogeneidade do material, o que dificulta uma classificação estrutural.

As descrições estruturais acima demonstram que espécies pertencentes à ordem Gigartinales biossintetizam diferentes tipos de galactanas, como: agaranas, carragenanas e do tipo DL-híbrida.

Embora esta grande variabilidade em biossintetizar diferentes tipos de galactanas seja mais acentuada nas famílias provenientes da antiga ordem Cryptonemiales, outras famílias típicas da ordem Gigartinales têm mostrado, com uma menor incidência, a presença de galactanas do tipo DL-híbrida. É importante ressaltar que estas galactanas "atípicas", não correspondem a seus principais polímeros. Como

por exemplo, na família Phyllophoraceae, há dois relatos no gênero *Gymnogongrus* (*G. torulosus* e *G. griffithsiae*), da presença de galactanas tipo DL-híbrida (ESTEVEZ et al., 2001; FARIA, 2002), além do polissacarídeo majoritário (*kappa*-carragenana). ESTEVEZ et al. (2000 e 2004) mostraram que a espécie de grande interesse comercial *Kappaphycus alvarezii*, pertencente à família Solieriaceae, produtora de *kappa*-carragenana, também biossintetiza galactanas tipo DL-híbrida e agaranas. Estes dois últimos tipos de galactanas representam aproximadamente 14% do total de galactanas obtidas por extração aquosa à 90 °C.

Em resumo, o detalhado estudo dos polissacarídeos produzidos em menor proporção, demonstram que algas denominadas de carragenófitas também podem biossintetizar agaranas e/ou galactanas tipo DL-híbrida.

## **1.5- ALGAS PRODUTORAS DE AGARANAS**

### **1.5.1- ORDEM GELIDIALES E GRACILARIALES**

As ordens Gelidiales e Gracilariales são típicas produtoras de agaranas com baixa proporção de substituição, sendo seus polissacarídeos de interesse industrial.

A ordem Gracilariales é bem explorada economicamente, sendo as algas do gênero *Gracilaria* amplamente cultivadas. No Brasil os estados de Pernambuco e Paraíba são os pioneiros no cultivo de algas marinhas para exploração econômica, especialmente as do gênero *Gracilaria*, as quais ocorrem naturalmente na região.

Os polissacarídeos das algas da ordem Gracilariales são mais substituídos que os da ordem Gelidiales. Podem apresentar suas unidades A metiladas em C-6, piruvatadas ou sem substituição. Suas unidades B podem estar na forma de 3,6-anidrogactose 3,6-anidro-2-O-metilgactose,  $\alpha$ -gactose,  $\alpha$ -gactose 6-sulfato ou ainda  $\alpha$ -gactose metilada em C-2 (MILLER, 1997).

A ordem Gelidiales apresenta 10 gêneros e aproximadamente 140 espécies (SANTELICES, 1990). A maioria das agaranas produzidas por algas desta ordem apresentam poucas substituições e temperatura de geleificação de 35°C.

O principal polímero obtido destas algas é a agarose (unidades alternates de  $\beta$ -D-galactopiranosose e 3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactopiranosose), podendo aparecer quantidades variadas de  $\alpha$ -L-galactopiranosose 6-sulfatada.

A agarana de *Gelidium amansii* apresentou traços de  $\alpha$ -L-galactose metilada em C-4,  $\beta$ -D-galactose 6-O-metilada e também a presença de unidades substituídas por xilose (ARAKI; HIRASE, 1960). IZUMI (1971) mostrou a presença nesta mesma espécie de frações contendo baixas porcentagens de sulfato (2,4% e 0,94%) e acetal de ácido pirúvico (1% e 6%).

Baixos percentuais de piruvatação das unidades A, e unidades B sulfatadas em C-6 foram encontradas nas espécies *Gelidium serrulatum* e *Gelidium floridanum* (LEMUS et al., 1991).

### 1.5.2- ORDEM CERAMIALES

De modo diferente das agaranas sintetizadas pelas das ordens anteriormente citadas, as quais apresentam estruturas relativamente simples, as da ordem Ceramiales têm grande complexidade estrutural.

O polissacarídeo da espécie *Laurencia pinnatifida* apresenta um padrão de substituição complexo, suas unidades A são na maioria sulfatadas em C-2 e as unidades B são encontradas na forma de  $\alpha$ -L-galactose metiladas em C-2 ou sulfatadas em C-6, e na forma de 3,6-anidrogactose que podem estar metiladas em C-2 (BOWKER; TURVEY, 1968).

USOV et al. (1989), estudando as galactanas de quatro espécies de *Laurencia* (*L. coronopus*, *L. nipponica*, *L. obtusa* e *L. papillosa*), demonstrou que as unidades A desta galactana podem estar metiladas, sulfatadas ou não substituídas em C-6. As

unidades B são constituídas por 3,6-anidrogactose ou  $\alpha$ -L-gactose (metiladas ou não em C-6).

Da espécie *Laurencia nipponica*, USOV e ELASHVILI (1991) obtiveram por hidrólise redutiva parcial oligossacarícarídios que confirmavam o trabalho anterior, e um dissacarídio composto por unidade A sulfatada em C-2 que não havia sido descrito anteriormente.

MILLER et al. (1993) mostraram que o polissacarídeo de *Laurencia thyrifera* também apresenta unidades A sulfatadas em C-2 e em C-6, não sulfatadas, ou substituídas por acetal de ácido pirúvico.

Padrão estrutural totalmente diferente aos de *Laurencia*, foi identificado na agarana sulfatada e piruvatada de *Acanthophora spicifera*. Esta apresenta unidades A substituídas por grupos sulfato em C-2 (28-30%), sulfato em C-2 e acetal de ácido pirúvico (9-15%) ou somente por acetal de ácido pirúvico (5-8%). Adicionalmente unidades A apresentam baixas porcentagens de grupo sulfato ou metil, ou não substituídas neste carbono. As unidades B são formadas principalmente por 3,6-anidro- $\alpha$ -L-gactose (15-16%) e  $\alpha$ -L-gactose 6-sulfato (10-17%) junto com menores proporções de 3,6-anidro- $\alpha$ -L-gactose 2-sulfato,  $\alpha$ -L-gactose 2,6-dissulfato,  $\alpha$ -L-gactose 2,3,6-trissulfato,  $\alpha$ -L-gactose 2,6-dissulfato com xilose em C-3, 2-O-metil- $\alpha$ -L-gactose e  $\alpha$ -L-gactose não substituída (DUARTE et al., 2004).

*Bostrychia montagnei*, sintetiza também uma agarana sulfatada e metilada de grande complexidade estrutural. Análises químicas e espectroscópicas demonstraram a presença de grande número de substituintes em diferentes posições, tanto nas unidades A como B (DUARTE et al., 2002). A agarana sulfatada desta espécie apresenta particularidades estruturais como a presença da  $\beta$ -D-gactopiranosose 4-sulfato e  $\alpha$ -L-gactopiranosose 3-sulfato. Estes substituintes não são comuns a agaranas. A presença de unidade B sulfatada em C-3 não é comum em polissacarídeos de algas vermelhas (MILLER et al., 1996). Este tipo de unidade impede o processo de ciclização, determinando assim que o teor de 3,6-anidrogactose nestas moléculas seja pré-estabelecido.

Outras espécies da família Rhodomelaceae apresentam principalmente substituição por grupos metil em C-6 das unidades A (*Osmundaria colensoi* e *Bryothamnion triquetrum*) (FERNÁNDEZ et al., 1987).

De modo similar as galactanas da família Rhodomelaceae, na família Ceramiaceae foi encontrado uma galactana extremamente complexa biossintetizada pela espécie *Ceramium rubrum*. Esta apresenta unidades A sulfatadas, metiladas ou não substituídas em C-6. Foi ainda relatada a possibilidade destas unidades apresentarem sulfato em C-2 e/ou C-4. As unidades B desta galactana podem estar na forma de 3,6-anidrogactose metilado em C-2 ou não substituído,  $\alpha$ -L-gactose metiladas em C-2, sulfatadas em C-6 ou ainda sem substituição, (TURVEY; WILLIAMS, 1976).

Na ordem Ceramiales duas espécies (*Rhodomela larix* e *Digenea simplex*) são relatadas como produtoras de galactanas do tipo DL-híbrida (TAKANO et al., 1999 e 2003).

Deste modo, galactanas do tipo DL-híbrida estão presentes tanto em algas tipicamente produtoras de carragenanas (Gigartinales) como de agaranas (Ceramiales).

## **1.6- ALGAS PRODUTORAS DE GALACTANAS DO TIPO DL-HÍBRIDAS**

### **1.6.1- ORDENS RHODYMENIALES E PLOCAMIALES**

Nos polissacarídeos da espécie *Lomentaria catenata* (Rhodymeniales) foram observadas estruturas de agarana e de carragenana, sugerindo uma galactana do tipo DL-híbrida com predomínio de agarana (TAKANO et al., 1994).

*Champia novae-zelandiae* (Rhodymeniales), também é produtora de uma galactana do tipo DL-híbrida com predomínio de agarana. Este polímero apresenta sulfato em C-2 de ambas unidades e em C-3 das unidades B. Este foi o primeiro relato

da presença de unidades B sulfatadas em C-2 e C-3 (MILLER et al., 1996). A presença de galactanas do tipo DL-híbrida sulfatadas em C-2 (unidade A) em algas da ordem Rhodymeniales, podem estar correlacionadas com as galactanas de espécies da ordem Halymeniales (MILLER, 1997). SAUNDERS e KRAFT (1996), consideraram as ordens Rhodymeniales e Halymeniales filogeneticamente correlacionadas. STORTZ e CEREZO (2000), argumentam que as coincidências estruturais de seus polissacarídeos podem ser levadas em consideração, para um futuro estudo taxonômico.

Na ordem Plocamiales, a galactana sulfatada da espécie *Plocamium costatum* apresentou quantidades equivalentes de unidades B na configuração enantiomérica D- e L-, porém não foi possível concluir se ambas pertencem a uma mesma molécula, ou ocorrem em moléculas separadas, por não terem purificado o material (FALSHAW et al., 1999).

### **1.6.2- ORDEM HALYMENIALES**

A antiga ordem Cryptonemiales *sensu* KYLIN (1956) juntamente com a ordem Gigartinales compreendiam 60% das famílias da divisão Rhodophyta, tendo suas representantes uma maior complexidade anatômica dentre as rodófitas. Uma íntima relação entre alguns taxons destas ordens sempre foi notada, porém a separação em duas ordens era mantida. Um ponto de importância taxonômica que define a ordem é a posição de uma célula auxiliar, que é denominada acessória para Cryptonemiales e não acessória para Gigartinales. A diferenciação da célula generativa segundo KRAFT e ROBINS (1985) é difícil, e baseados neste problema, provisoriamente uniram a ordem Cryptonemiales a Gigartinales.

SAUNDERS e KRAFT em 1996, sequenciaram o gene 18S do rRNA de representantes das famílias de Dumontiaceae, Endocladaceae, Halymeniaceae, e Kallymeniaceae (ordem Cryptonemiales *sensu* KYLIN, 1956), e das famílias de Mychodeaceae, Phyllophoraceae, Schizymeniaceae, e Sebdeniaceae (ordem Gigartinales). Os autores usaram estes dados moleculares para validar a junção



taxonômica da ordem Cryptonemiales à ordem Gigartinales, como proposta por KRAFT e ROBINS, com exceção das famílias Halymeniaceae e Sebdeniaceae, as quais passaram a formar uma nova ordem (Halymeniales).

A seguir serão descritas características estruturais de alguns polissacarídeos da ordem Halymeniales, incluído as galactanas do tipo DL-híbridas (mesmo que não tenham recebido anteriormente esta denominação).

A família Halymeniaceae (antiga família Grateloupiaceae e Cryptonemiaceae da ordem Cryptonemiales), se encontra atualmente como membro da ordem Halymeniales (Tabela-2).

As algas pertencentes a esta família biossintetizam galactanas semelhantes a carragenanas, porém com L-galactose em baixas porcentagens, variáveis graus de metoxilação e padrões incomuns de sulfatação (STORTZ; CEREZO, 2000). Deste modo, vem sendo observada uma grande heterogeneidade química nestas galactanas.

Dentre estas, foram isolados polissacarídeos denominados aeodanos,  $\lambda$ -carragenana além de galactanas do tipo DL-híbrida.

Os aeodanos foram obtidos pela primeira vez de algas do gênero *Aeodes* (NUNN; PAROLIS, 1968 e ALLSOBROOK et al., 1971, 1974), e sua estrutura geral nunca foi claramente estabelecida. Segundo USOV et al. (1980), os aeodanos possuem uma estrutura básica de carragenana, porém com uma pequena porcentagem de  $\alpha$ -L-galactose, os grupos sulfato se localizam apenas nas unidades A, principalmente em C-2 e C-4, e os grupos metoxil estão localizados em C-6 das unidades A e em C-2 das unidades B.

De acordo com PAROLIS (1981), as aeodanas do gênero *Aeodes*, bem como as isoladas de *Phyllymenia hieroglyphica*, apresentam predominância de ligações (1→3). Uma estrutura não alternante para galactanas de algas marinhas não foi até a presente data comprovada, desde que nenhum oligossacarídeo sem estrutura alternante foi isolado.

O gênero *Pachymenia* é representado por várias espécies, cujos polissacarídeos apresentam grande complexidade estrutural. A galactana sulfatada, isolada de *Pachymenia lusoria*, é constituída por galactose, 6-O-metilgalactose, 2-O-metilgalactose, 3,6-anidrogallactose, 3,6-anidro-2-O-metilgalactose e xilose (43; 21; 18; 10; 5 e 3 mol%, respectivamente) (MILLER et al., 1995). A configuração absoluta das unidades de galactose foi determinada na forma de (+)-2-butil-glicosídeos, seguida de análise por cromatografia líquida gasosa. Enquanto as unidades dos monossacarídeos, 6-O e 2-O-metilgalactose, pertencem exclusivamente a série D-, as unidades de D- e L-galactose estão em uma proporção de aproximadamente 4:1.

**TABELA-2 CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DE GALACTANAS EXTRAÍDAS DE ESPÉCIES DA ORDEM HALYMENIALES.**

Espécies	Sulfato (%)	[α] <sub>D</sub>	G2S	AG (%)	2AG (%)	2Gal/ 4Gal/ 6Gal	Gal D : L	Unidade B (D e L)	Xil	Ac. Pir. (%)	Tipo de galactana
<i>Grateluopia lanceola</i> <sup>1</sup>	30,0	+54,9	+	10,2	-	+ / - / +	50,5	nd	nd	nd	λ-carragenana
<i>G. divaricata</i> <sup>2</sup>	21,0	+41,9	nd	7,1(L)	-	nd	4:1	+	+	nd	λ- carragenana + agarana
<i>G. elliptica</i> <sup>3</sup>	25,0	+45,0	nd	8,1(D)	tr (L)	+(L) / +(D)/ -	9:1	+	+	2,92	κ- e λ-carragenana
<i>G. filicina</i> <sup>4</sup>	20,4	nd	+	3,7	-	nd	+	nd	nd	0,18	λ- e π-carragenana
<i>G. indica</i> <sup>5</sup>	17,25	+62,0	nd	1,8	-	nd	+	nd	nd	nd	λ- carragenana
<i>G. indica</i> <sup>6</sup>	20,3	+47,0	nd	15(D) 3(L)	-	-	1:1,8	+	tr	nd	DL-Híbrida
<i>G. turuturu</i> <sup>7</sup>	26,0	+32,1	nd	3(L)	-	+ / + / +	4:1	+	+	2,9	λ- carragenana + agarana
<i>Pachymenia lusoria</i> <sup>8</sup>	nd	nd	+	10(L)	5,2	+(D)/ - / +(D)	4:1	+	+	+	
<i>P. hymantophora</i> <sup>9</sup>	nd	nd	+	4(D)	-	-	+	nd	tr	nd	Aeodana
<i>P. carnosa</i> <sup>10</sup>	32,5	+70,0	+	1,4	-	+(D)/ +(D e L)/+(D)	+	+	-	nd	Aeodana
<i>P. crassa</i> <sup>11</sup>	nd	nd	nd	4	10,9	+ / - / +	+	nd	-	nd	
<i>Aeodes ulvoidea</i> <sup>12</sup>	19,9	+34,0	+	1,4	-	+(D)/ +(L)/ +(D)	+	+	tr	+	Aeodana
<i>A. orbitosa</i> <sup>13</sup>	nd	+79,0	+	0,1	-	+(D)/ +(L)/ +	58	nd	+	nd	Aeodana+ λ-carragenana
<i>Phyllymenia cornea</i> <sup>14</sup>	19,6	+63,3	+	0,4 – 0,56	-	+(D)/ + (L)/ +(D)	+	+	+	+	Philimenana
<i>P. hieroglyphica</i> <sup>9</sup>	20,5	+44,0	+	<1	-	-	+	nd	nd	nd	Aeodana
<i>Halymenia ceylaica</i> <sup>15</sup>	34,3	nd	nd	7,0	-	nd	nd	nd	+	0,417	
<i>H. porphyroides</i> <sup>5</sup>	23,4	+56,3	nd	2,95	-	nd	nd	nd	nd	nd	λ-carragenana
<i>H. venusta</i> <sup>16</sup>	29,8	+72,5	nd	5,08	-	nd	nd	nd	nd	nd	λ -carragenana
<i>Cryptonemia crenulata</i> <sup>17</sup>	25,6	+25,6	nd	14,5	-	nd	nd	nd	nd	nd	ι-carragenana
<i>C. crenulata</i> <sup>18</sup>	28,3	+23,5	+	15,8	8,6	+ (D e L)/ - / -	10,6:1	+	+	2,8	DL-Híbrida

G2S = β-D-galactose 2-sulfato, AG = 3,6-anidrogallactose, 2AG = 3,6-anidro-2-O-metilgalactose, 2Gal = 2-O-metilgalactose, 4Gal = 4-O-metilgalactose, 6Gal = 6-O-metilgalactose, Gal D:L = D-galactose : L-galactose, Xil = xilose e Ac. Pir. = ácido pirúvico. <sup>1</sup>BAEZA e MATSUHIRO (1977); <sup>2</sup>USOV et al. (1980); <sup>3</sup>HIRASE et al. (1967); HIRASE e WATANABE (1972); <sup>4</sup>ZABACKIS e PEREZ (1990); PARK et al. (1976); <sup>5</sup>PAREKH et al., 1989; <sup>6</sup>SEN et al. (2002); <sup>7</sup>USOV et al. (1975); <sup>8</sup>MILLER et al. (1995); <sup>9</sup>PAROLIS (1981); <sup>10</sup>FARRANT et al. (1971 e 1972), PAROLIS (1978); <sup>11</sup>MILLER et al. (1997); <sup>12</sup>ALLSOBROOK et al. (1971 e 1974); <sup>13</sup>NUNN e PAROLIS (1968); <sup>14</sup>NUNN e PAROLIS (1970); <sup>15</sup>LAI et al. (1994); <sup>16</sup>PAREKH et al. (1987); <sup>17</sup>SAITO e OLIVEIRA (1990); <sup>18</sup>ZIBETTI, 2001.

Embora atualmente a configuração absoluta, das unidades de 3,6-anidrogactose, possa ser determinada utilizando derivado quiral, ERREA et al., (1998), MILLER et al. (1995), através da hidrólise redutiva parcial obtiveram oligossacarídeos contendo este anidroaçúcar. Neste tipo de hidrólise, há clivagem preferencial das ligações glicosídicas das unidades de 3,6-anidrogactose, as quais são transformadas em 3,6-anidrogactitol. Por este método, foi isolado de *P. lusoria*, apenas agarobiitol (dissacarídeo contendo D-gactose-(1→4)-3,6-anidro-L-gactitol), e não carrabiitol (dissacarídeo contendo D-gactose-(1→4)-3,6-anidro-D-gactitol). A presença de 3,6-anidro-L-gactose, foi ainda confirmada por análise de RMN de  $^{13}\text{C}$ , pela presença do sinal 98,2 ppm, característico destas unidades quando pertencentes a série enantiomérica L- (USOV et al., 1980). Grupos sulfato estão localizados em C-2 de todas as unidades de  $\beta$ -D-gactopirranose, as quais estão parcialmente substituídas por grupos metil ou acetal de ácido pirúvico. A unidade B deste polímero é constituída principalmente por 2-O-metil-D-gactose (~50%), D-gactose (~25%) e L-gactose (~25%).

Posteriormente, MILLER et al. (1997), analisaram a composição monossacarídica e os espectros de RMN dos polissacarídeos de *P. lusoria*, coletada no sul e no norte da Nova Zelândia. Os polissacarídeos das algas coletadas no norte apresentam espectros de RMN e composição monossacarídica similares, com 12-17% de 2-O-metilgactose. O teor deste derivado nas amostras do sul foi menor (2-6%), levando os autores à conclusão de que as amostras do sul e do norte são espécies distintas. Este estudo permitiu avaliar, que os polissacarídeos da espécie denominada de *P. laciniata*, (coletadas no norte e no sul), são idênticas as correspondentes *P. lusoria* coletadas no mesmo local. Estes resultados de composição monossacarídica de gactanas podem auxiliar na classificação de espécies de algas marinhas, que apresentem problemas de definição taxonômica.

Espécies como *P. crassa* e *P. carnosa*, que são bem definidas taxonomicamente, apresentaram composição monossacarídica diferenciada, de acordo com o derivado metilado, 6-O-metilgactose (20,9 e 9,5 mol%,

respectivamente), (MILLER et al., 1997). Enquanto os polissacarídeos, das espécies de *Pachymenia* relatadas anteriormente apresentam grupos O-metil, os de *P. hymantophora* (PAROLIS, 1981), são desprovidos deste tipo de substituinte. Neste caso, a análise de composição monossacarídica é um fator importante em termos taxonômicos.

Os polissacarídeos da *Pachymenia carnosa* foram extensivamente estudados. Nos primeiros estudos desta espécie, FARRANT et al. (1972) consideraram que a galactana sulfatada apresentava uma estrutura alternante. Posteriormente fundamentado nos resultados de metilação, PAROLIS (1978), concluiu que havia um predomínio das ligações (1→3). Esta conclusão foi baseada assumindo que o derivado 2,6-di-O-metilgalactose era proveniente das unidades glicosidicamente ligadas em C-3 e sulfatadas em C-4. A análise de metilação do correspondente polímero, dessulfatado por metanólise ácida, apresentou aproximadamente iguais quantidades de 2,4,6- e 2,3,6-tri-O-metilgalactose. No entanto, o autor ressalta que as unidades 3-O-substituídas, são mais susceptíveis a hidrólise por metanol-HCl, o que justificaria iguais quantidades de unidades 3- e 4-O-substituídas no polímero dessulfatado.

Os polissacarídeos isolados de algas do gênero *Grateloupia* são ricos em unidades de L-galactose, e nestes, parte das unidades B, se encontram como 3,6-anidrogallactose. Embora apresentando relativamente alta porcentagem de L-galactose, há nos polissacarídeos de algas deste gênero predominância do isômero D- (USOV; BARBAKADZE, 1978). Tal fato é explicado pelos referidos autores devido à presença de blocos de agaranas e carragenanas na mesma molécula. Ressalta-se, no entanto que nenhum oligossacarídeo de estrutura DL-híbrida como, por exemplo, do tipo D-L-D-D, foi isolado até a presente data, muito provavelmente devido à estrutura em blocos proposta por USOV e BARBAKADZE, (1978) e por STORTZ e CEREZO (2000).

A espécie *G. filicina* é utilizada como alimento, no Hawaii e na Coreia. ZABACKIS e PEREZ (1990), utilizando algas desta espécie, coletadas no Hawaii, isolaram uma galactana que apresentou 3,6-anidrogallactose (3,7%), ácido pirúvico

(0,18%) e sulfato (20,4%). Através da análise do espectro de infravermelho desta galactana, os autores concluíram que a mesma apresentava características similares a uma  $\lambda$ -carragenana. Estes autores ressaltam que o polissacarídeo desta espécie, estudado por PARK et al. (1976), as quais foram coletadas na Coréia, apresentavam 20,3% de 3,6-anidrogactose. Tal diferença numa mesma espécie é contestada por CHOPIN et al. (1994), que sugerem um estudo mais detalhado dos polissacarídeos pertencentes a esta espécie, com uma exata classificação taxonômica.

Recentemente SEN et al. (2002), caracterizaram uma galactana do tipo DL-híbrida, na espécie *Grateloupia indica*, através da análise do produto da metanólise parcial do polissacarídeo nativo onde encontraram uma proporção de carrabiose: agarobiose de 1:0,21, e também por determinação de D- e L-gactose no polímero dessulfatado e metilado (D:L = 1:0,48), consistente com uma galactana constituída por estruturas de agarana e carragenana. Este polímero ainda apresentou uma potente atividade anticoagulante (SEN et al., 1994). É importante ressaltar que anteriormente o polissacarídeo biossintetizado pela mesma espécie *G. indica* foi classificada como uma galactana do tipo *lambda*-carragenana (PAREKH et al., 1989); no entanto neste estudo o polímero foi analisado apenas por espectroscopia de infravermelho e dosagem colorimétrica do teor de 3,6-anidrogactose e sulfato.

SAITO e OLIVEIRA (1990), preocupados com a produção de carragenanas no Brasil, uma vez que o país importa 200 toneladas de carragenanas por ano, realizaram um *screening* das algas encontradas na costa brasileira. Neste trabalho, a alga *Cryptonemia crenulata*, também pertencente à família Halymeniaceae, foi classificada como produtora de *iota*-carragenana. Esta conclusão foi baseada apenas em dados de espectroscopia de infravermelho, determinação fotolorimétrica do teor de 3,6-anidrogactose e sulfato. É importante ressaltar que este foi o único trabalho que relata a presença de uma *iota*-carragenana na antiga ordem Cryptonemiales. Recentemente, nesta espécie citada, foi parcialmente caracterizada uma galactana sulfatada do tipo DL-híbrida (ZIBETTI, 2001) (Tabela-2, pág. 21).

Com base nos estudos estruturais descritos anteriormente com diferentes espécies da ordem Halymeniales, pode-se observar que, além de agaranas e carragenanas com distintas características estruturais, várias espécies desta ordem biossintetizam polissacarídeos do tipo DL-híbrida, onde em uma mesma molécula são encontradas estruturas típicas de carragenanas e agaranas. Tal fato não foi observado, pelo menos com frequência, em espécies pertencentes a outras ordens de rodófitas. As galactanas do tipo DL-híbrida da ordem Halymeniales apresentam algumas características estruturais que são notadas com grande frequência (Tabela-2) como: a presença de  $\beta$ -D-galactose 2-sulfato, presença de unidades de  $\alpha$ -galactose e/ou 3,6-anidro- $\alpha$ -galactose nas configurações L- e D-, as quais podem estar metiladas em carbono-2.

Tal fato demonstra a necessidade da realização da estrutura química fina dos polissacarídeos das algas pertencentes a esta ordem.

Ao analisar a presente descrição estrutural de galactanas de diferentes ordens, é possível claramente observar que determinadas ordens biossintetizam como polímero principal galactanas do tipo DL-híbrida, porém em outras ordens conhecidas como típicas produtoras de carragenanas ou agaranas, também foi relatada, com uma menor incidência a presença destas galactanas do tipo DL-híbrida.

A variedade estrutural destes ficocolóides, dependendo da espécie é considerada como um importante indicador taxonômico da filogenia das rodófitas. Desta forma, algumas revisões (MILLER, 1997; CHOPIN et al., 1999; STORTZ; CEREZO, 2000) têm mostrado uma importância quimiotaxonômica dos polissacarídeos isoladas das algas vermelhas, bem como apontam a necessidade de estudos estruturais mais detalhados.

## 1.7- APLICAÇÃO DAS GALACTANAS SULFATADAS

### 1.7.1- APLICAÇÃO INDUSTRIAL

As algas marinhas apresentam uma grande importância econômica, pois fazem parte da dieta alimentar principalmente nos países orientais, bem como podem ser diretamente utilizadas como fertilizantes (VAN DEN HOEK et al., 1989).

As galactanas sulfatadas são conhecidas como ficocolóides, devido a suas propriedades geleificantes e viscosantes em sistemas aquosos.

As carragenanas são amplamente utilizadas na indústria alimentícia, na produção de diversos produtos como: geléias, carnes processadas, gelatinas, produtos derivados do leite, clarificante de cerveja, entre outros. Também podem ser usadas pelas indústrias têxtil, petroquímica, de papel e farmacêutica (DE RUITER; RUDOLPH, 1997).

As agaranas são comercialmente obtidas a partir de espécies como *Porphyra*, *Gelidium*, *Pterocladia* e *Gracilaria*, as quais são amplamente utilizadas na alimentação e tecnologia: indústria farmacêutica e alimentícia, entre outras (LEE, 1989). No Japão ocorre a maior produção mundial de agaranas.

A habilidade destes polímeros (agaranas e carragenanas) em formar géis e soluções viscosas está diretamente relacionada com a conformação estrutural do polissacarídeo e esta com a presença de unidades de 3,6-anidrogactose (USOV, 1984).

Este monossacarídeo é unicamente encontrado em galactanas de algas vermelhas, distinguindo-os dos demais polissacarídeos biossintetizados por outros grupos vegetais (USOV, 1984). As unidades anidrogactosídicas são formadas naturalmente na alga através da atividade da enzima sulfohidrolase a partir de unidades precursoras de galactose 6-sulfato e/ou galactose 2,6-dissulfato (LAWSON; REES, 1970; WONG; CRAIGIE, 1978; McCANDLESS; CRAIGIE, 1979; ZINOUN et al., 1997).



As unidades 3,6-anidrogactosídicas podem também ser obtidas quimicamente, através de tratamento alcalino, onde em meio básico o grupo sulfato é liberado num processo de eliminação seguido pela formação do anel 3,6-anidro, com a perda de uma molécula de água, caracterizando uma reação de substituição nucleofílica bimolecular ( $S_N2$ ), denominada reação de ciclização alcalina (CIANCIA, 1994).

As unidades de  $\alpha$ -galactose passam de uma conformação  $^4C_1$  para  $^1C_4$  em carragenanas, e de  $^1C_4$  para  $^4C_1$  em agaranas (CIANCIA, 1994). Esta mudança aproxima o oxigênio da hidroxila do C-3 e o sulfato no C-6, favorecendo o ataque nucleofílico.

Desta forma, o estudo da cinética química da reação de ciclização, permite determinar a velocidade de ciclização destas unidades precursoras. Esta reação alcalina promove um aumento do poder geleificante do polissacarídeo, podendo fornecer dados importantes, para que, em nível industrial, este tratamento químico seja feito de maneira adequada (temperatura e tempo).

Além de ser um processo de importância industrial, o tratamento alcalino pode ainda ser utilizado para caracterização estrutural das gactanas. Neste âmbito pode ser utilizada para a quantificação de unidades precursoras na molécula nativa, bem como pode sugerir a presença de substituintes em diferentes posições, os quais influenciam a velocidade de ciclização.

Como exemplo do efeito de grupos sulfato sobre a velocidade de ciclização, podem ser citadas as carragenanas da família *lambda* (unidade A sulfatada em C-2) as quais apresentam uma velocidade de ciclização mais lenta do que as carragenanas da família *kappa* (unidade A sulfatada em C-4). A presença de grupos sulfato em C-2 das unidades A (*lambda*-carragenana) protegem a ionização das hidroxilas do C-3 das unidades precursoras, dificultando a ciclização (CIANCIA et al., 1993; NOSEDA; CERREZO, 1995).

### 1.7.2- APLICAÇÃO BIOLÓGICA

Além da aplicação nos diferentes setores da indústria, as galactanas sulfatadas são promissoras na área biomédica, devido às propriedades biológicas apresentadas. Entre estas, podemos destacar a atividade anticoagulante (CARLUCCI et al., 1997), antitumoral, anti-angiogênica (SATORU et al., 2003), antiviral (DAMONTE et al., 1996, PUJOL et al., 1996, CÁCERES et al, 2000, DUARTE et al., 2004,) e atividade antidengue (DAMONTE et al., 2002).

As galactanas sulfatadas podem apresentar potente atividade antiviral contra diversos vírus envelopados como o vírus herpes simplex (HSV), vírus da imunodeficiência humana (HIV) e citomegalovírus, dependente da sua estrutura química fina. Fatores importantes como grau de sulfatação e principalmente o posicionamento destes substituintes no polímero, permite uma conformação adequada, as quais são essenciais para a inibição do processo de infecção viral.

O herpes simplex vírus tipo 1 (HSV-1) é capaz de infectar e de contaminar uma ampla variedade de células humanas. A infecção é mediada por glicoproteínas do envelope viral, as quais possuem específicas funções. A infecção envolve a ligação do vírus na membrana da superfície da célula (etapa de adsorção viral), seguida pela penetração do vírus e entrada do nucleocapsídeo no citoplasma.

Tem sido demonstrado que as glicoproteínas gC ou gB presentes no envelope viral estão envolvidas na fase inicial da ligação do vírus, interagindo com o heparan sulfato da superfície da célula alvo (HEROLD et al, 1995). Esta interação facilita a ligação da glicoproteína gD do envelope viral aos receptores HVEM (herpes vírus entry mediators). Este processo de ligação permite a penetração do vírus na célula por fusão do envelope viral com a membrana plasmática celular, permitindo a entrada do DNA viral.

A substituição por grupos sulfato em polissacarídeos é essencial para atividade anti-HSV-1 (CARLUCCI et al., 1997, DUARTE et al., 2001).

Em colaboração com o grupo de Virologia do Departamento de Química Biológica da Universidade de Buenos Aires, tem sido avaliada a atividade antiherpética de galactanas sulfatadas.

As agaranas de *Acanthophora spicifera* (DUARTE et al., 2004) apresentam suas unidades A principalmente sulfatadas em C-2, enquanto as unidades B estão na forma precursora ( $\alpha$ -L-galactose 6-sulfato) ou na forma de 3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactose. Estas agaranas apresentam seletiva e potente atividade contra as cepas HSV-1 e HSV-2, sendo desprovidas de atividade citotóxica contra células Vero (células de rim de macaco verde Africano) até a concentração de 1000  $\mu$ g/mL. Assim como em outras galactanas sulfatadas, o efeito inibitório das agaranas de *Acanthophora spicifera*, deve-se à inibição da adesão do vírus a célula hospedeira, impedindo assim a entrada do vírus. A etapa inicial de adesão inicia-se pela interação de glicoproteínas do envelope viral (gC ou gB) com o heparan sulfato (HS) da célula do hospedeiro (WUDUNN; SPEAR, 1989; LYCKE et al., 1991; SHIEH et al., 1992).

FREYZI et al. (1997) demonstraram que a mínima seqüência na interação do HS com a glicoproteína gC do HSV-1 é a seqüência  $[\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-L-(}^1\text{C}_4\text{)-IdoA2-OSO}_3\text{-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-(}^4\text{C}_1\text{)-GlcNR6'-OSO}_3\text{-(1}\rightarrow ]$  com no mínimo 10-12 unidades repetitivas. O padrão médio de sulfatação das agaranas de *A. spicifera* é similar à mínima seqüência do HS  $[\rightarrow 3)\text{-}\beta\text{-L-(}^4\text{C}_1\text{)-Galp2-OSO}_3\text{-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-(}^1\text{C}_4\text{)-Galp6'-OSO}_3\text{-(1}\rightarrow ]$ , o qual pode ser responsável pela formação do complexo polissacarídeo-gC (DUARTE et al., 2004).

Portanto, a determinação da estrutura química fina destes polímeros naturais é muito importante, tanto para a correta aplicação industrial nos diferentes setores da indústria, quanto para o estudo das atividades biológicas ou ainda sob o aspecto de caráter taxonômico.

## **2- OBJETIVOS**

### **2.1- OBJETIVO GERAL**

Este trabalho tem como objetivo geral o estudo dos polissacarídeos solúveis em meio aquoso biossintetizados por diferentes espécies de algas vermelhas da ordem Halymeniales.

### **2.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Extração e purificação dos polissacarídeos solúveis em meio aquoso (à 25 °C e a 80 °C).

2. Determinação da massa molecular média dos principais polissacarídeos homogêneos por cromatografia de gel permeação (HPSEC-MALLS).

3. Despolimerização parcial dos polissacarídeos homogêneos.

4. Determinação da estrutura química fina dos principais polissacarídeos e dos seus respectivos produtos parcialmente despolimerizados, por métodos químicos e espectroscópicos.

5. Estudo comparativo da cinética de ciclização dos principais polissacarídeos.

6. Correlacionar a atividade antiherpética com a estrutura química das galactanas de *Cryptonemia crenulata*.

7. Comparação dos resultados de análises estruturais dos polissacarídeos das diferentes espécies, visando determinar se há, ou não um padrão de substituição característico para as galactanas isoladas de algas pertencentes à ordem Halymeniales.

### **3- MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1- MÉTODOS ANALÍTICOS GERAIS**

3.1.1 A dosagem de açúcar total foi realizada pelo método do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al. 1956), com sensibilidade entre 10-100 µg, utilizando-se como padrão galactose na concentração de 70 µg/mL. A leitura foi realizada no comprimento de onda de 490 nm.

3.1.2 As dosagens de proteínas foram realizadas pelo método de LOWRY et al. (1951), utilizando-se o reativo de Folin-Ciocalteu e solução de soro-albumina bovina cristalina como padrão na concentração de 40 mg%. A leitura foi realizada no comprimento de onda de 660 nm. A sensibilidade do método é de 5-100 µg.

3.1.3 O teor de sulfato foi determinado pelo método de DODGSON (1961). Após hidrólise das amostras com HCl 1 M, 5 horas, 105°C, foi adicionado o reativo gelatina-bário (neste reativo o cloreto de bário será solubilizado na gelatina) assim formará sulfato de bário que fica suspenso neste fluido. Como padrão foi utilizado solução de sulfato de sódio na concentração de 1 mg/mL, diluído em HCl 1M. A leitura foi realizada no comprimento de onda de 360 nm. A sensibilidade do método está na faixa de 20-200 µg de sulfato.

3.1.4 A determinação do teor de piruvato, após liberação deste por hidrólise com ácido oxálico 0,02 M, 1 hora, 120°C, foi realizado de acordo com o método da 2,4-dinitrofenilhidrazina (KOEPSELL; SHARPE, 1952), tendo como padrão ácido pirúvico 0,25 µM. A leitura foi realizada no comprimento de onda de 380 nm. Os valores obtidos desta determinação foram corrigidos segundo DUCKWORTH e

YAPHE (1970), devido à interferência das unidades de 3,6-anidrogactose (AG), utilizando a fórmula abaixo.

$$\% \text{ác. pir. (corrigido)} = \frac{\% \text{ác. pir. (dosado)} \times \% \text{ác. pir. (agarose)} \times \% \text{AG (amostra dosada)}}{\% \text{AG (agarose)}}$$

A agarose sem ácido pírúvico para eletroforese (Sigma) foi utilizada como padrão para o cálculo da correção, esta agarose apresenta 47,3 mol% de 3,6-anidrogactose (AG) e apresentou 7,5 mol% de ácido pírúvico, decorrente da interferência do 3,6-anidrogactose.

3.1.5 O conteúdo de 3,6-anidrogactose foi determinado pelo método fotolorimétrico do resorcinol (Yaphe, 1960).

3.1.6 A determinação da rotação óptica específica ( $[\alpha]_D$ ) foi realizada em polarímetro RUDOLPH RESEARCH, modelo Autoplol III, a 20°C, com as amostras analisadas na concentração de 0,2 g% em água.

### 3.2- ESPÉCIES ESTUDADAS E SEUS POSICIONAMENTOS SISTEMÁTICOS

As espécies estudadas neste trabalho foram: as algas *Cryptonemia crenulata*, *Cryptonemia seminervis* e *Halymenia floridana*.

Divisão: Rhodophyta

Classe: Rhodophyceae

Ordem: Halymeniales

Família: Halymeniaceae

Gênero: *Cryptonemia*

Espécie: *Cryptonemia crenulata* (J. Agardh) J. Agardh

Espécie: *Cryptonemia seminervis* (C. Agardh) J. Agardh

Gênero: *Halymenia*

Espécie: *Halymenia floridana* J. Agardh

### 3.3- COLETA E PROCESSAMENTO

A alga *Cryptonemia crenulata* foi coletada na Praia do Cupe, no estado de Pernambuco, em 1999. *Cryptonemia seminervis* foi coletadas em Marataízes - Espírito Santo, em março de 2002, e a espécie *Halymenia floridana* foi coletada na ilha do Farol na praia de Caiobá - Paraná, de junho a novembro de 2004. As algas foram classificadas com o auxílio da Dr<sup>a</sup> Silvia Maria Pita de Beuclair Guimarães do Instituto de Botânica/SP.

Os respectivos exemplares das três espécies foram separadamente lavados com água doce, secos à sombra e moídos em moinho de faca (WILEY MILL). As algas secas e moídas foram submetidas ao processo de extração descrito a seguir.

Alguns exemplares da espécie *C. crenulata* estão depositados no Herbário da UFPR, departamento de Botânica, sob o número UPCB-46432. As outras espécies ainda não foram catalogadas.

### 3.4- EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS

#### 3.4.1- EXTRAÇÃO DAS GALACTANAS DE *Cryptonemia crenulata* E *Cryptonemia seminervis*

As algas *Cryptonemia crenulata* (27,7 g) e *Cryptonemia seminervis* (92,0 g) secas e moídas foram submetidas à extração aquosa (1,5% p/v) sob agitação mecânica a 25 °C, por 4 horas e 30 minutos. O extrato foi centrifugado (10000 g por 5 minutos), obtendo-se um resíduo e um sobrenadante. Ao sobrenadante foi adicionado de etanol (3 volumes) e acetato de potássio (0,1 g%). O resíduo foi novamente submetido a extração aquosa a 25 °C, como descrito anteriormente. Os precipitados etanólicos das duas extrações aquosas a 25 °C foram reunidos e ressolubilizados em água, dialisados seqüencialmente contra água destilada, NaCl 1M, água destilada e liofilizados. As frações polissacarídicas obtidas de *C. crenulata* e *C. seminervis* foram denominadas de C1 e S1, respectivamente. Os

respectivos resíduos da última extração aquosa a 25 °C foram suspensos em tampão fosfato 0,025M, pH 6,5 (1,5% p/v) sob agitação mecânica, à 80 °C por 6 horas. Após centrifugação (10000 g por 10 minutos) aos sobrenadantes foi adicionado etanol (3 volumes) e acetato de potássio. O precipitado obtido, após centrifugação, foi ressolubilizado em água e dialisado como descrito anteriormente e liofilizado. O processo de extração a 80 °C foi repetido por mais duas vezes. Os polissacarídeos solúveis em água à 80° C obtidos na primeira e segunda extração foram reunidos obtendo-se as frações C2 e S2. As frações C3 e S3 são correspondentes aos polissacarídeos obtidos na terceira extração a 80 °C.

#### **3.4.2- EXTRAÇÃO DAS GALACTANAS DE *Halymenia floridana***

A alga (*Halymenia floridana*) seca e moída (4,5 g) foi submetida à extração com tampão fosfato 0,025 M, pH 6,5 (1,5% p/v) sob agitação mecânica, à 80°C, por 6 horas. Após centrifugação (10000 g por 10 minutos), ao sobrenadante foi adicionado etanol (3 volumes) e acetato de potássio. A alga residual foi submetida a uma segunda extração a 80 °C, como descrito anteriormente. Os precipitados etanólicos obtidos das duas extrações a 80 °C foram reunidos, ressolubilizados em água, dialisados seqüencialmente contra água destilada, NaCl 1M, água destilada e liofilizados. A fração polissacarídica obtida de *H. floridana* foi denominada de H.

#### **3.5- TRATAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS COM KCl**

As frações polissacarídicas C1 e C2 de *C. crenulata*, S1, S2 e S3 de *C. seminervis*, e a fração H de *H. floridana* foram solubilizadas em água (0,25% p/v), e tratados com KCl sólido em concentrações crescentes (0 - 2M), como adição de 0,1 em 0,1 M. Após cada adição a amostra permanecia em repouso de 6 horas à 2° C. Os extratos polissacarídicos foram centrifugados, e os respectivos sobrenadantes e precipitados dialisados contra água destilada e liofilizados. Os



polissacarídeos solúveis em KCl 2M obtidos a partir das frações C1, C2, S1, S2, S3 e H foram denominados de C1S, C2S, S1S, S2S, S3S e H2S respectivamente, e os polissacarídeos insolúveis foram denominadas de C1P, C2P, S1P, S2P, S3P e H2P.

### **3.6- PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE *C. seminervis* POR CROMATOGRAFIA DE TROCA-IÔNICA.**

As frações polissacarídicas C1S, C2S e S2S, solúveis em KCl 2M, foram submetidas a fracionamento através de cromatografia de troca-iônica em coluna contendo DEAE-Sephacel, utilizando-se como eluente: água e soluções de NaCl de concentração ascendente.

A eluição foi monitorada pelo teste do fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956). De *C. crenulata* foram obtidas a partir de C1S as frações denominadas de C1S-1, C1S-2 e C1S-3, as quais foram eluídas com NaCl: 0,3; 0,4 e 0,7M, e a partir de C2S foram obtidas as frações C2S-1, C2S-2, C2S-3 e C2S-4, as quais foram eluídas com água, e NaCl 0,5; 1,0 e 1,5M, respectivamente. De *C. seminervis* foram obtidas as frações S2S-1, S2S-2, S2S-3, S2S-4 e S2S-5, as quais foram eluídas com NaCl 0,25; 0,5; 0,75; 1,0 e 1,5M, respectivamente.

### **3.7- HIDRÓLISE ÁCIDA TOTAL DO TIPO HIDRÓLISE REDUTIVA**

A composição monossacarídica foi determinada com 1-2 mg de polissacarídeo, de acordo com o método de FALSHAW e FURNEAUX (1994), o qual é uma modificação do método original descrito por STEVENSON e FURNEAUX (1991), que se processa em duas etapas:

- Na primeira etapa, utiliza-se ácido trifluoroacético (TFA) na concentração de 3 M, e um agente redutor, complexo 4-metil-morfolina borano, o qual possui

estabilidade em meio reacional ácido, à temperatura de 90°C por 15 minutos, com a finalidade de reduzir as unidades de 3,6-anidrogallactopiranosose, protegendo-as da degradação em meio ácido, nesta etapa é realizada uma pré-hidrólise.

- Na segunda etapa, a concentração do TFA é ajustada para 2 M pela adição da solução do complexo 4-metil-morfolina borano, à temperatura de 120 °C por 90 minutos. Nesta condição há hidrólise das ligações glicosídicas envolvendo as demais unidades constituintes do polissacarídeo, as quais por sua vez serão também reduzidas.

Os correspondentes alditóis foram acetilados (anidrido acético/TFA concentrado na proporção de 2:1) e analisados na forma de acetatos de alditóis por cromatografia líquido-gasosa (CLG) e/ou CG-EM (cromatografia líquido-gasosa - espectrometria de massa).

### **3.8- HIDRÓLISE ÁCIDA TOTAL**

Com o objetivo de diferenciação de derivados simétricos (3- e 4-O-metil-galactose), 1-2 mg de polissacarídeo foi submetido seqüencialmente a hidrólise ácida total (ácido fórmico 45%, 100°C, 16 h), redução com NaBD<sub>4</sub> (12 h) e acetilação (anidrido acético 0,4 g %, 120°C, 1,5 h), seguida por análise por CG-EM.

### **3.9-DESSULFATAÇÃO POR TRATAMENTO SOLVOLÍTICO**

#### **3.9.1- PREPARO DO SAL DE PIRIDÔNIO**

O processo de solvólise foi conduzido com os polissacarídeos na forma de sal de piridônio. Este sal foi formado através da solubilização das frações em água e então foi adicionado resina catiônica DOWEX 50x8 na forma H<sup>+</sup>, sob agitação magnética à temperatura ambiente por 30 minutos. O pH do sobrenadante ficou

entre 1-2. O filtrado (obtido por filtração à pressão reduzida) foi neutralizado (em capela) com piridina, até pH 7,0 e liofilizado (NAGASAWA et al., 1979).

### **3.9.2- SOLVÓLISE**

O polissacarídeo, na forma de sal de piridônio, foi solubilizado em uma mistura de dimetilsulfóxido, metanol e piridina, cuja proporção foi de 89:10: 1 v/v/v, respectivamente, respeitando-se a relação de 10 mg de polissacarídeo para 3 ml de mistura (NAGASAWA *et al.*, 1979).

A solução resultante foi mantida a 100 °C durante 4 horas. Após o resfriamento, a fração solvolisada foi submetida à diálise exaustiva contra água destilada e liofilizada. O polissacarídeo dessulfatado foi submetido à metilação conforme descrito no item 3.12.

## **3.10- TRATAMENTO ALCALINO**

### **3.10.1- TRATAMENTO ALCALINO ANALÍTICO**

A reação de ciclização alcalina foi realizada segundo a metodologia de CIANCIA et al. (1993). De acordo com a metodologia, ao polissacarídeo previamente reduzido com boroidreto de sódio, foi adicionado hidróxido de sódio 3 M (concentração final 1 M). A mistura foi mantida em banho termostatizado a 80 °C. Foram retiradas alíquotas em diferentes intervalos de tempo, as quais foram neutralizadas com HCl (1M). O conteúdo de 3,6-anidrogactose foi determinado pelo método fotolorimétrico do resorcinol (Yaphe, 1960) em cada uma das alíquotas.

Com os valores de absorbância obtidos para cada intervalo de tempo, pela dosagem do teor de 3,6-anidrogactose, foi aplicada a fórmula:  $\ln(A_0 - A_\infty / A_t - A_\infty)$ , onde:

$A_0$  = absorbância no tempo zero indica a concentração inicial de unidades precursoras.

$A_\infty$  = absorbância que indica a concentração de unidades totais que ciclizaram.

$A_t$  = absorbância do tempo reacional.

Assim através da plotagem gráfica dos valores obtidos pela equação (eixo Y) em função do tempo (eixo X), é possível calcular a constante de velocidade da reação (k), representada pela pendente da reta obtida e o tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) obtido a partir de k pela equação  $t_{1/2} = \ln 2/k$ .

### **3.10.2- DETERMINAÇÃO DO TEOR DE 3,6-anidrogallactose**

O teor de 3,6-anidrogallactose foi determinado pelo método do resorcinol (Yaphe, 1960), assim 0,1 mL da amostra (obtidas em diferentes intervalos de tempos por tratamento alcalino – método analítico), 0,7 mL de água e 4 mL do reativo de resorcinol que consiste de 9 mL de solução de resorcinol (15 mg de resorcinol em 10 mL de água), e 1 mL de acetal (1 mL de acetal em 24 mL de água) e 100 mL de ácido clorídrico fumegante. Os tubos vedados foram submetidos à temperatura de 80 °C em banho termostaticado por 10 minutos. Após resfriamento em banho de gelo a leitura da absorbância foi realizada a 555 nm.

### **3.10.3- TRATAMENTO ALCALINO PREPARATIVO**

Ao polissacarídeo (100 mg) previamente solubilizado em água destilada (0,2 g%), foi adicionado borohidreto de sódio (10% em relação à massa do polissacarídeo). Após repouso de 12 horas a 4 °C, adicionou-se hidróxido de sódio 3 M (concentração final 1 M) e a mistura foi mantida em banho termostaticado a 80 °C por 5 horas para a fração C2S-3 e por 2 horas para a fração S2S-3 (NOSEDA; CEREZO, 1995).

A reação foi monitorada pela determinação do teor de 3,6-anidrogallactose, até alcançar valor constante, através do método do resorcinol (YAPHE, 1960).

Após resfriamento, diálise, e liofilização, a amostra foi submetida à hidrólise redutiva segundo FALSHAW e FURNEAUX (1994), e analisadas por CLG e/ou CG-EM na forma de acetatos de alditóis, esta amostra também foi metilada como descrito no item 3.12.

### **3.11- DETERMINAÇÃO DA CONFIGURAÇÃO ENANTIOMÉRICA**

As determinações das configurações enantioméricas e as quantificações das unidades de D- e L-galactose, e de 2-O-metil-galactose foram realizadas pelo método descrito por CASES et al. (1995). Nesta metodologia os polissacarídeos sofrem uma aminação redutiva (agente redutor cianobohidreto de sódio), na presença do álcool quiral (S)-1-amino-2-propanol, e acetilação, formando assim seus derivados 1-deoxi-(2-hidroxipropilamina) alditóis, que são separados e quantificados por CLG. Para o derivado 2-O-metilgalactose o amino álcool é substituído por (S)- $\alpha$ -metilbenzilamina.

Para a determinação de D- e L- 3,6-anidrogalactose, foi utilizado o método descrito por ERREA et al. (1998), onde o polissacarídeo é submetido a uma hidrólise oxidativa parcial, para a obtenção dos correspondentes ácidos 3,6-anidroaldônicos, os quais são convertidos a *séc*-butil ésteres diastereoisoméricos acetilados, que são quantificados por CLG, (coluna SP-2330, 0,25 mm d.i x 30m).

Estas derivatizações e análises foram realizadas pelo Dr. José Estevez do Departamento de Química Orgânica da Universidad de Buenos Aires (UBA), com a qual o grupo de química de carboidratos – Algas Marinhas (UFPR), mantém colaboração científica.

### **3.12- METILAÇÃO**

O processo de metilação do polissacarídeo na forma de sal de trietilamônio foi conduzido de acordo com o método de CIUCANU e KEREK (1984). Após solubilização em DMSO (1 mL para cada 15 mg de polissacarídeo) foi adicionado NaOH pulverizado (30 mg) e após agitação mecânica vigorosa (20 minutos), foi adicionado iodometano (0,1 mL) sob agitação mecânica vigorosa (20 minutos). Este processo (adição de NaOH e iodometano) foi repetido por mais 2 vezes completando-se assim uma etapa de metilação. A cada etapa as frações são dialisadas e liofilizadas para então serem, se necessário, novamente metiladas. Após cada etapa de metilação as frações polissacarídicas foram hidrolisadas de acordo com o método de FALSHAW e FURNEAUX (1994), acetiladas (anidrido acético/TFA concentrado, a 50 °C por 15 minutos) e analisadas por CLG e/ou CG-EM, na forma de acetatos de alditóis parcialmente metilados.

A trideutereometilação (ICD<sub>3</sub>) foi conduzida em algumas das galactanas de maneira idêntica à descrita anteriormente.

### **3.13- MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS**

#### **3.13.1- CROMATOGRAFIA LÍQUIDO-GASOSA**

As análises por cromatografia gasosa foram realizadas em Cromatógrafo HEWLETT PACKARD 5890, com detector de ionização de chama (300° C) e injetor (250° C), utilizando nitrogênio como gás de arraste e coluna capilar de sílica fundida (30 m X 0,25 mm d.i.), DB-225 (0,25 µm), em diferentes temperaturas: análises cromatográficas para acetatos de alditóis foram realizadas à 220° C, e as amostras de acetatos de alditóis parcialmente metilados foram realizadas à 210° C.

### **3.13.2- CROMATOGRAFIA LÍQUIDO-GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA (CG-EM)**

As análises cromatográficas em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa foram realizadas em cromatógrafo a gás “VARIAN”, modelo 3.300, acoplado a um espectrômetro de massa de marca FINNIGAN MAT, modelo ITD 800 e/ou VARIAN – SATURN 2000R, equipado com coluna capilar de sílica fundida (30 m X 0,25 d.i.) DB-225 e/ou DB-223, marca J.W. As injeções nas colunas foram feitas mantendo-se a temperatura inicial em 50°C, por minuto, seguido de aumento de acordo com a programação de temperatura em um gradiente de 40°C por minuto, até 230°C, mantendo-se constante a partir deste valor. Foi utilizado gás hélio como gás de arraste, com fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>. As áreas dos picos de interesse foram determinadas por integração em software. Os espectros de massa serão obtidos por impacto de elétrons a 70 eV, repetidamente a cada 1/8 de segundo, de m/e (relação carga/massa) 80 a 220. Este método foi utilizado para quantificação de acetatos de alditóis (SLONEKER, 1972), sendo identificados por meio de seus tempos de retenção e perfis característicos de fragmentação por impacto de elétrons (JANSSON et al., 1976 e CARPITA; SHEA, 1989), comparado com padrões.

### **3.13.3- CROMATOGRAFIA DE GEL PERMEAÇÃO (HPSEC-MALLS) – ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE E MASSA MOLECULAR**

Determinação da variação do índice de refração com relação à concentração (dn/dc): soluções de 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 mg da amostra em 1 mL de NaNO<sub>3</sub> 0,1M e azida de sódio (NaN<sub>3</sub>) 200 ppm, foram previamente filtradas em membranas Millipore 0,45 µm e armazenadas em frascos viais rigorosamente limpos. As análises foram realizadas utilizando-se injeções de 500 µL de cada solução em HPLC acoplado a detector de espalhamento de luz, com fluxo de 0,6 mL.min<sup>-1</sup> e pressão de 67 psi a 20°C.

Para as análises de homogeneidade e de determinação da massa molecular ponderal média ( $M_w$ ), foi preparado uma solução de 2 mg da amostra em 1 mL de nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_3$  0,1 M) e azida de sódio ( $\text{NaN}_3$  200 ppm) dissolvidas em água millique, previamente filtradas em membranas Millipore (acetato de celulose) de 0,45 e 0,22  $\mu\text{m}$ . A análise foi realizada utilizando-se injeções de 500  $\mu\text{L}$  de solução em HPLC acoplado a detector de espalhamento de luz, com fluxo de 0,6  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Para a determinação da massa molecular ponderal média foi utilizado o valor de  $dn/dc$  que foi obtido juntamente à análise de homogeneidade.

As análises de homogeneidade e de determinação do valor de  $M_w$  foram realizadas em cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC) WATERS, equipado com um detector de índice de refração diferencial WATERS modelo 2410 e com detector de espalhamento de luz em multiângulos (MALLS) WYATT TECHNOLOGY modelo DAWN DSP com 18 detectores dispostos ao redor da fotocélula em diferentes ângulos. Foram utilizadas 4 colunas de gel permeação WATERS, com limites de exclusão de  $1\cdot 10^6$ ,  $4\cdot 10^5$ ,  $8\cdot 10^4$  e  $5\cdot 10^3$ , em série. O eluente utilizado foi uma solução de ( $\text{NaNO}_3$  0,1M) contendo  $\text{NaN}_3$  (200 ppm), pressão de 920 psi a 20 °C.

Foi utilizado o programa ASTRA (WYATT TECHNOLOGY), para analisar os dados obtidos. Para cada amostra pode se efetuar uma medida do espalhamento do feixe luminoso em função da concentração do polímero e em função do ângulo. A relação que permite calcular  $M_w$  é:

$$\frac{Kc(1+\cos^2\theta)}{\Delta R_\theta} = (1/M_w + 2A_2C = \dots)P^{-1}(\theta)$$

onde  $K = (2\pi^2 n^2 / \lambda_o^4 N) / (dn/dc)^2$

$n$  = índice de refração do solvente no comprimento de onda  $\lambda_o$

$\lambda_o$  = comprimento de onda da luz incidente

$N$  = número de Avogadro

$dn/dc$  = taxa de variação do índice de refração com a concentração



$c$  = concentração do polímero

$\theta$  = ângulo do feixe de luz espalhado

$A_2$  = segundo coeficiente virial

$P(\theta)$  = função que leva em consideração as interferências entre as diferentes vibrações emitidas por uma mesma partícula

$\Delta R_\theta$  = diferença entre o  $R_\theta$  da solução e o  $R_\theta$  do solvente

$R_\theta$  = fator de Rayleigh, calculado através da seguinte equação

$$R_\theta = \frac{G_\theta \cdot D}{G_o \cdot \sigma' \cdot 1'}$$

Onde  $G_\theta$  é a intensidade relativa correspondente ao feixe espalhado,  $G_o$  a intensidade relativa correspondente ao feixe incidente,  $D$ ,  $\sigma'$ ,  $1'$  são constantes do aparelho.

### **3.14- DESPOLIMERIZAÇÃO DAS GALACTANAS UTILIZANDO HIDRÓLISE REDUTIVA PARCIAL**

A hidrólise reductiva parcial foi realizada segundo método de USOV e ELASHVILI (1991), sendo, no entanto realizada algumas modificações na concentração do TFA e no tempo de hidrólise como descrito a seguir. Para 200 mg de polissacarídeo foi adicionado água destilada (15 mL) e TFA 2M (5 mL). Esta mistura foi mantida a 60 °C (por aproximadamente 15 minutos), até completa solubilização do polissacarídeo. Após adição do complexo 4-metil-morfolina borano (1,35 g) a mistura foi mantida a 65 °C por 6 horas. Ao término deste período o TFA foi removido por co-destilação com água destilada.

A hidrólise parcial da fração C2S-3 foi realizada com 600 mg e de S2S-3 com 700 mg.

### 3.15- FRACIONAMENTO E PURIFICAÇÃO DAS GALACTANAS PARCIALMENTE DESPOLIMERIZADAS OBTIDAS POR HIDRÓLISE REDUTIVA PARCIAL

Conforme relatado por GONÇALVEZ et al. (2001), o maior problema em relação à purificação dos oligossacarídeos é devido a presença do complexo 4-metil-morfolina borano. Com base neste trabalho, o hidrolisado da fração C2S-3 foi aplicado em uma coluna contendo DEAE-Sephadex A-25 (volume total da coluna 20 mL). A amostra foi eluída com água e posteriormente com gradiente contínuo de NaCl (0-0,5 M), em seguida um gradiente descontínuo (0,5; 0,6; 0,7; 0,9; 1,0 e 1,5 M).

As frações obtidas por cromatografia de troca-iônica (CA, CB, CC e CD), devido a grande quantidade de sal foram submetidas à extração com DMSO (3 vezes). Após centrifugação, foi feita a precipitação com clorofórmio (3 volumes), evaporação, solubilização em água destilada, liofilização, para então serem ressolubilizadas e aplicadas em coluna contendo BioGel P-2 (volume total de 170 mL e volume morto de 48 mL). Utilizou-se água destilada como eluente e a detecção dos açúcares foi feita pelo método de fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956).

O volume morto foi determinado através da cromatografia de dextran Blue (componente com massa molecular acima do limite de inclusão do gel), foi acompanhado por leitura do eluato aquoso em espectrofotômetro (625 nm).

O hidrolisado da fração S2S-3 de *C. seminervis* foi tratado de maneira diferente. Após evaporação do ácido por co-destilação com água à pressão reduzida, o produto de hidrólise foi dialisado contra água destilada (em membrana de diálise de 14.000 Da) e liofilizado. O material liofilizado foi denominado de CS.

### **3.16- RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR**

As análises de ressonância magnética nuclear (RMN) monodimensionais foram realizadas em espectroscópio da marca BRUKER, modelo DRX 400, série Avance, em probe de diâmetro externo de 5 mm ou 10 mm, com as amostras dissolvidas em água deuterada ( $D_2O$ ), a temperatura de 50 ou 70°C. Os deslocamentos químicos, expressos em  $\delta$  (ppm), foram determinados utilizando acetona como padrão interno tanto para as análises de  $^{13}C$  ( $\delta = 30,2$  ppm) como para  $^1H$  ( $\delta = 2,224$  ppm).

#### **3.16.1- RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE CARBONO-13 (RMN - $^{13}C$ )**

Os espectros de RMN- $^{13}C$  foram obtidos na frequência base de 100,61 MHz, com intervalo de aquisição de sinal de 0,6 segundos, sendo feitas de 4.000 – 100.000 aquisições, utilizando-se um intervalo de 0,1 segundo entre os pulsos.

#### **3.16.2- RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE PRÓTON (RMN – $^1H$ )**

Os espectros de RMN- $^1H$  foram obtidos na frequência base de 400,13 MHz, sendo necessário promover a troca dos hidrogênios das hidroxilas por deutério e a remoção completa das moléculas de água presentes, através da dissolução das frações em  $D_2O$ , congelamento e liofilização (este processo deverá ser repetido no mínimo por 3 vezes), com a finalidade de diminuir a intensidade do sinal relativo ao OH, o qual prejudica a qualidade do espectro obtido.

### **3.16.3-HMQC (HETERONUCLEAR MULTIPLE QUANTUM CORRELATION SPECTROSCOPY)**

Esta técnica heteronuclear permite determinar quais átomos de hidrogênio ( $^1\text{H}$ ) estão ligados a quais átomos de carbono ( $^{13}\text{C}$ ).

### **3.17-ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR)**

Os espectros FT-IR foram obtidos pelo uso de espectrômetro BOMMEN, modelo MB-100, incorporado a Transformada de Fourier. As amostras (2 mg) foram homogeneizadas com brometo de potássio (KBr) e analisadas sob a forma de pastilhas.

As análises de FT-IR foram realizadas no Departamento de Química da UFPR.

### **3.18-DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIHERPÉTICA DAS GALACTANAS DE *C. crenulata***

Os experimentos de análises antivirais apresentados neste trabalho foram realizados no laboratório de Virologia do Departamento de Química Biológica da Universidade de Buenos Aires (Argentina) pelo grupo da Dr<sup>a</sup>. Elsa B. Damonte. Com este laboratório o grupo de Química de Carboidratos de algas marinhas da UFPR mantém colaboração científica fornecendo amostras de carboidratos sulfatados e aliando os resultados de atividade antiviral com os estruturais.

- As células utilizadas para os ensaios antivirais foram as células Vero (linha de células de rim de macaco verde africano *Cercopithecus aethiops*), crescidas em meio essencial mínimo de Eagle (MEM) suplementado com 5% (v/v) de soro fetal bovino. Para o meio de manutenção (MM) foi utilizado uma concentração de 1,5% de soro fetal bovino.

- Os vírus HSV-1 cepa F e HSV-2 cepa G foram obtidos da American Type Culture Collection (Rockville, USA) e utilizados como cepas de referência. A cepa B2006 é um HSV-1 TK<sup>-</sup> resistente a aciclovir obtida pelo Professor Dr. E. De Clercq (Intituto Rega, Bélgica). O vírus HSV-2 cepa MS foi fornecido pelo Dr. F. Benencia (Laboratório de Imunoquímica, UBA, Argentina). As variantes (1C3-syn 13-8) e (1C3-syn 14-1) de HSV-1 foram obtidas por passagens seriadas na presença de *mu/nu*-carragenana 1C3 como descrito por CARLUCCI et al. (2002). Os estoques virais foram propagados e titulados pela formação de placas virais em células Vero.

- As frações polissacarídicas submetidas a análise antiviral foram: C1, C2, C3, C1S, C2S, C2S-1, C2S-2, C2S-3 e C2S-4 de *C. crenulata*.

### **3.18.1- ENSAIO CITOTÓXICO**

A viabilidade das células Vero frente as galactanas de *C. crenulata* foi medida pelo método do MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]. As culturas, em placas de 96 poços, foram expostas a diferentes concentrações dos polissacarídeos (com três poços para cada concentração) e incubadas a 37°C por 1h. Após este período 10 µl de MM contendo MTT (concentração final 5 µg/ml) foi adicionado em cada poço, sendo as placas virais incubadas a 37°C. O sobrenadante foi removido e 200 µl de etanol foi adicionado a cada poço, para solubilizar os cristais de formazan. Após agitação vigorosa, a absorbância foi medida em leitor de microplacas a 595 nm. A concentração citotóxica 50% (CC<sub>50</sub>) foi calculada como a concentração do polissacarídeo necessária para reduzir a viabilidade celular em 50% quando comparada ao controle.

### 3.18.2-FORMAÇÃO DE PLACAS EM CÉLULAS Vero

Células Vero crescidas em monocamada foram infectadas com diluições seriadas da amostra de vírus e mantidas a 37°C por 1h com agitação a cada 20 minutos. Após adsorção os inóculos foram retirados e as monocamadas cobertas com meio foram incubadas por 48h a 37°C, em estufa com ambiente de CO<sub>2</sub>. Após este período o meio foi removido, as células foram fixadas com formol 10% durante 15 minutos e as monocamadas foram coradas com cristal violeta 1%, o que permite contar as placas de lise produzidas pelo vírus.

Título (PFU/ml) =  $n / v \cdot d$

PFU: unidades formadoras de placas

n: número médio de placas

v: volume do inóculo

d: diluição na qual é possível contar corretamente as placas

Neste ensaio foram também determinados os números de placas de lise produzidos pelo vírus nas células Vero, na ausência de qualquer composto, funcionando como controle negativo. O resultado é dado como unidades formadoras de placas (PFU). Este resultado é muito importante uma vez que a atividade antiviral, (determinada posteriormente), expressará a percentagem (em relação ao controle), em que o composto (no caso as galactanas sulfatadas), em uma determinada concentração, reduz o número de placas virais (PFU).

### 3.18.3-DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL *in vitro*

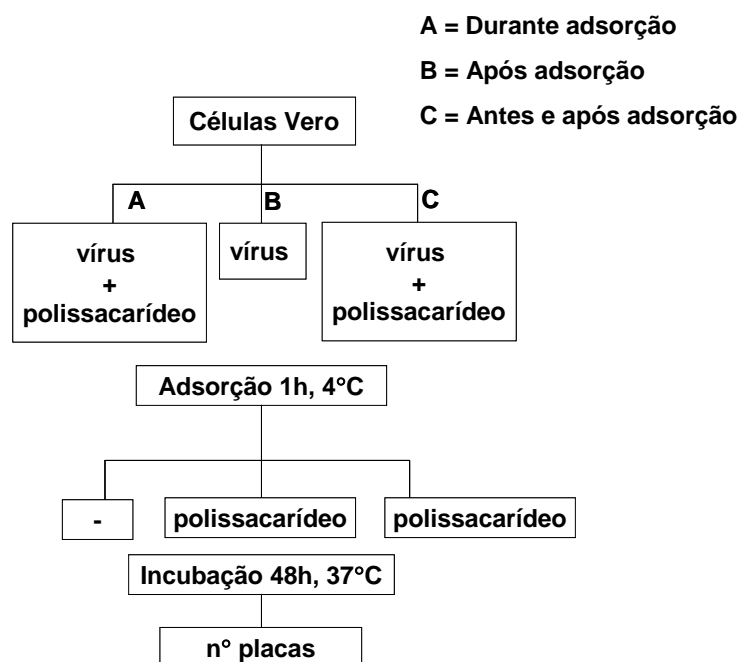
A atividade antiviral das frações polissacarídicas foi avaliada *in vitro* pelo método de redução do número de placas virais (CANDEIAS, 1996).

Monocamadas confluentes de células Vero crescidas sobre multiplacas de 24 poços, foram infectadas com aproximadamente 50 PFU (unidades formadoras

de placas) de vírus por poço, na ausência ou presença de diferentes concentrações das frações polissacarídicas. Após 1h de incubação (37°C), os inóculos residuais foram removidos e adicionou-se o MM contendo 0,7% de metilcelulose e a correspondente dose de cada polissacarídeo. As placas foram incubadas a 37°C por 48hs em estufa com ambiente de CO<sub>2</sub>. Após este período o meio foi removido e o número de placas virais formadas foi contado como descrito no item 3.18.2. A concentração inibitória 50% (IC<sub>50</sub>) foi calculada como a concentração do polissacarídeo necessária para reduzir 50% da citopatogenicidade viral quando comparada ao controle. Cada determinação foi executada duas vezes em duplicada.

Para a determinação do efeito do período de incubação na atividade antiviral das galactanas sulfatadas, células Vero crescidas sobre multiplacas de 24 poços foram infectadas com 50 PFU de HSV-1, cepa F em meio MM contendo diferentes concentrações de polissacarídeo ou na ausência deste. Após incubação de 1h a 4°C, o meio contendo os vírus não adsorvidos foram removidos e as culturas celulares foram lavadas (duas vezes) com PBS. Após adição de 0,5 mL de MM contendo 0,7% de metilcelulose, com ou sem o polissacarídeo, as placas foram incubadas por 48hs a 37°C (Esquema-1). Após este período foi realizada a contagem do número de placas virais como descrito no item 3.18.2.

**ESQUEMA-1 REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO ENSAIO PARA DETERMINAÇÃO DO EFEITO DO PERÍODO DE INCUBAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS SOBRE O HSV-1.**



### 3.18.4-DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE VIRUCIDA

Uma suspensão viral contendo  $4 \times 10^5$  PFU de HSV-1 cepa F, foi incubada (1h30 a  $37^\circ\text{C}$ ) com igual volume de MM na presença ou ausência de diferentes concentrações das frações polissacarídicas. As amostras foram então diluídas em MM para determinar a infectividade residual pelo método de formação de placas. A concentração virucida 50% ( $\text{VC}_{50}$ ) expressa a concentração de galactana requerida para inativar o vírus em 50% em relação ao controle.



### 3.18.5-ENSAIOS *in vivo* DE PROTEÇÃO A INFECÇÃO PELO HSV-2

Camundongos fêmeas BALB/c com 46 a 48 semanas de vida foram utilizadas para o ensaio de proteção contra a inoculação vaginal com HSV-2 cepa MS. Antes da inoculação, os animais receberam uma injeção subcutânea (20 µL) de acetato de medroxiprogesterona (Medrosterona, Gardor, Argentina), preparada na concentração de 25 mg/mL em solução de PBS para aumentar a susceptibilidade dos ratos a infecção com HSV-2. Após cinco dias os animais foram divididos em 4 grupos de 10 animais cada um. Nos grupos 1 e 2 os animais receberam intravaginalmente instilações de 50 µL da fração polissacarídica C2 de *C. crenulata* (8 mg/mL em PBS). Os animais do grupo 3 foram receberem 50 µL de C2 (0,8 mg/mL em PBS), e os animais do grupo 4 foram inoculados com PBS. Um minuto após receberem C2 ou placebo, os ratos dos grupos 2 - 4 foram inoculados intravaginalmente com  $1 \times 10^5$  PFU (unidades formadoras de placas) de HSV-2 cepa MS, enquanto que os animais do grupo 1 receberam PBS. Uma segunda dose de C2 na correspondente concentração foi administrada duas horas após a inoculação de PBS (grupo 1) ou HSV-2 (grupos 2 e 3) . O grupo 4 foi tratado com PBS. Os animais foram examinados quanto a morbidade e mortalidade durante 20 dias.

Amostras de secreções vaginais foram coletadas após três dias da infecção por lavagem da vagina com 100 µL de PBS. O material coletado foi congelado a -70°C e posteriormente utilizado para se determinar a infectividade do HSV-2 pelo ensaio de placas.

Os dados foram analisados pelo teste do Qui-quadrado. Um valor de  $p = 0,005$  ou menor foi considerado significativo.

## 4.1 RESULTADOS E DISCUSSÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE *Cryptonemia crenulata*

### 4.1.1 OBTENÇÃO E ANÁLISES DAS FRAÇÕES BRUTAS DE *C. crenulata*

FIGURA-3 FOTO DA ALGA *C. crenulata*



Posição taxonômica da alga *C. crenulata*:

Divisão: Rhodophyta

Classe: Rhodophyceae

Sub Classe: Florideae

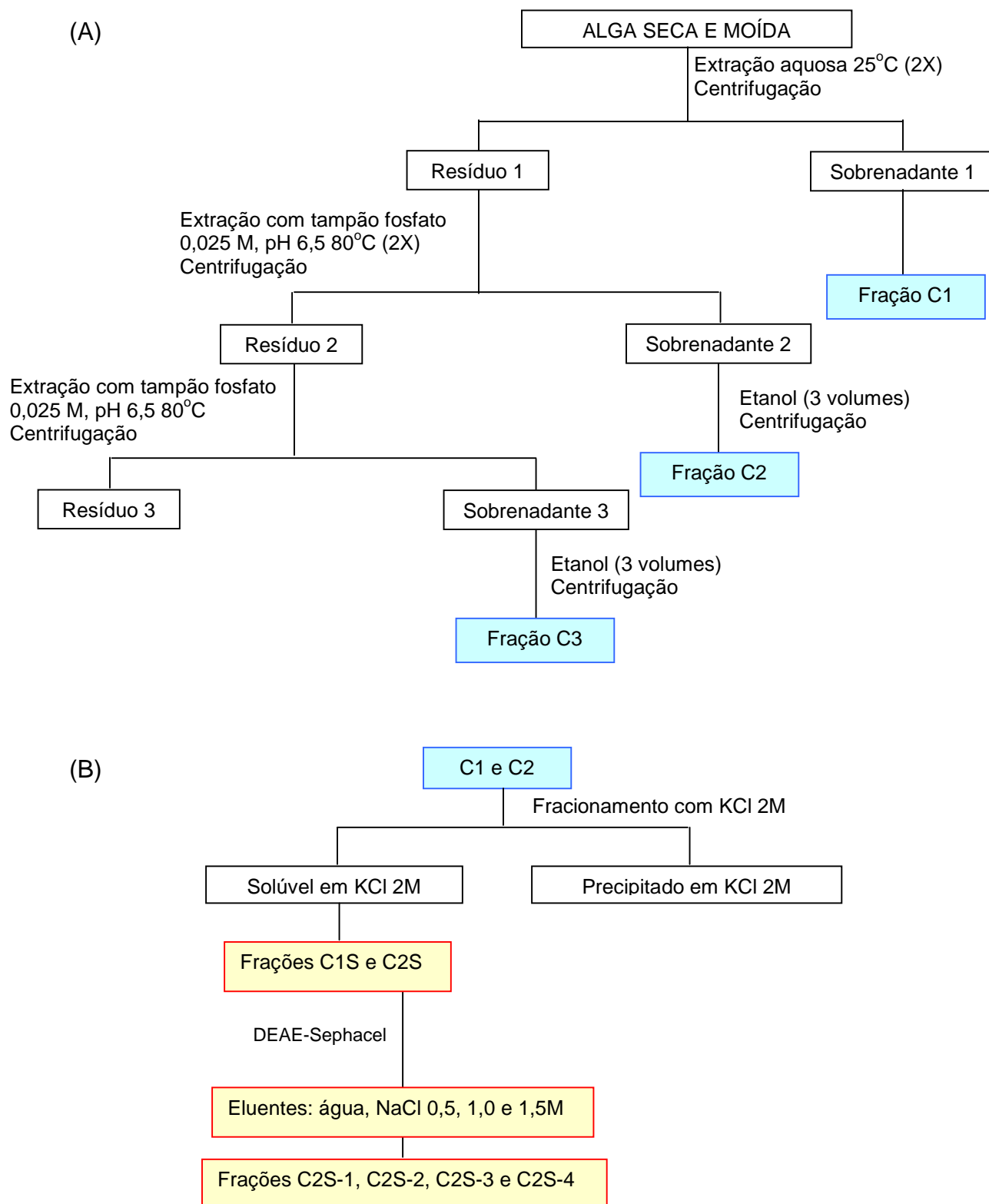
Ordem: Halymeniales

Família: Halymeniaceae

Gênero: *Cryptonemia*

Espécie: *Cryptonemia crenulata* (J. Agardh) J. Agardh

**ESQUEMA-2 EXTRAÇÃO (A) E FRACIONAMENTO (B) DOS POLISSACARÍDEOS  
OBTIDOS DA ALGA VERMELHA *Cryptonemia crenulata*.**



Os polissacarídeos solúveis em meio aquoso de *C. crenulata* foram obtidos de acordo com o Esquema-1, (ZIBETTI, 2001). As duas extrações aquosas a 25°C foram reunidas e denominadas de C1, representando 4,0% do material inicial.

Seqüencialmente, a alga residual (Resíduo-1, Esquema-2 A) foi submetida a duas extrações aquosas a temperatura de 80°C, utilizando tampão fosfato 0,025 M. O material obtido de cada extração a quente foi tratado separadamente, dando origem às frações C2 e C3 (6,8% e 1,1% de rendimento, respectivamente). O rendimento total em polissacarídeos solúveis em meio aquoso de *C. crenulata* foi de aproximadamente 12,0%, valor este compatível com o obtido para outras algas da antiga ordem Cryptonemiales (CHOPIN et al., 1994).

As três frações brutas (C1, C2 e C3) apresentaram na sua composição a galactose (65,0 - 70,7%) como principal monossacarídeo além de 3,6-anidrogactose (7,3 - 10,8%) e seu derivado 2-O-metilado (5,9 - 8,3%) e 2-O-metilgalactose (5,9 - 8,9%) e traços de 4-O- e 6-O-metilgalactose. Glucose foi detectada em quantidades similares (5,8 - 7,5%) tanto nos extratos a 80°C quanto a 25°C (Tabela-3). A presença de glucose é geralmente proveniente de contaminação do polissacarídeo de reserva das algas vermelhas (amido das florídeas) (USOV, 1992).

Como podemos ainda observar na Tabela-3, as frações brutas apresentam alto teor de sulfato (22 - 42%), e também mostram a presença de acetal de ácido pirúvico. É importante ressaltar que este tipo de substituinte, acetal de ácido pirúvico, foi pela primeira vez encontrado em algas vermelhas por HIRASE (1957) em galactanas do tipo agarana. Em 1972, HIRASE e WATANABE demonstraram também a presença de acetal de ácido pirúvico em galactanas do tipo carragenana.

Em todas as espécies de algas relatadas até o presente, o acetal de ácido pirúvico se encontra como 4,6-O-(1'-carboxietilideno)- $\beta$ -D-galactopiranosose, portanto substituindo os carbonos 4 e 6 das unidades A, tanto de galactanas do tipo agarana (CHOPIN et al. 1994), quanto de carragenanas (MILLER et al., 1995).

Na ordem Halymeniales substituições por acetal de ácido pirúvico são encontradas em baixas proporções (Tabela-2, p. 21).

**TABELA-3 ANÁLISE QUÍMICA E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES C1, C2 E C3 DE *C. crenulata*.**

Fração	Sulfato <sup>a</sup> (%)	Ác. Pirúvico (%)	Monossacarídeos (mol %)						
			Gal <sup>b</sup>	AG	2AG	2Gal	4Gal	6Gal	Glc
C1	22,0	6,3	70,7	7,3	5,9	8,9	1,4	-	5,8
C2	28,0	2,9	66,4	9,5	7,9	6,0	1,1	1,6	7,5
C3	42,0	1,4	65,0	10,8	8,3	5,9	-	2,6	2,5

<sup>a</sup>Expresso como Na SO<sub>3</sub>.

<sup>b</sup> Abreviatura dos monossacarídeos (Ga I= galactose; AG = 3,6-anidrogactose; 2AG = 3,6-anidro-2-O-metilgalactose; 2Gal = 2-O-metilgalactose; 4Gal = 4-O-metilgalactose; 6Gal = 6-O-metilgalactose e Glc = glucose).

A fração C2 foi solubilizada em água destilada na concentração de 0,25 g% e tratada com KCl, com um aumento gradual do sal, até a concentração de 2 M. Esta metodologia de fracionamento foi primeiramente descrita por CERZO (1967) que realizou o fracionamento de um sistema de galactanas da alga *Gigartina skottsbergii* (ordem Gigartinales), isolando diversas frações que precipitavam em diferentes concentrações de KCl.

Neste fracionamento com KCl, 97% da fração C2 permaneceu solúvel em KCl 2M e foi denominada de C2S (Esquema-2 B).

A análise química da fração C2S mostrou a presença de 27,7% de sulfato e 3,7% de ácido pirúvico.

Com a finalidade de se determinar a enantiomericidade das unidades monossacarídicas constituintes, a fração C2S foi submetida a análises enantioméricas das unidades de galactose e de seus derivados monometilados pelo método de CASES et al. (1995), e as das unidades anidrogactosídicas pelo método de ERREA et al. (1998).

No método descrito por CASES et al. (1995), o polissacarídeo sofre uma aminação redutiva, na presença de um álcool quiral (S)-1-amino-2-propanol; após

acetilação formam os derivados 1-deoxi-(2-hidroxi-propilamina) alditóis que são separados e quantificados por CLG. Para as unidades de 2-O-metilgalactose o amino álcool é substituído por (S)- $\alpha$ -metilbenzilamina. Na determinação enantiomérica das unidades anidrogactosídicas pelo método de ERREA et al. (1998), o polissacarídeo é submetido a uma hidrólise oxidativa, obtendo-se os correspondentes ácidos aldônicos, os quais são convertidos a *séc*-butil ésteres diastereoisômeros acetilados, que são enfim quantificados por CLG.

Como pode ser observado na Tabela-4, a análise enantiomérica das unidades monossacarídicas constituintes mostrou a presença majoritária de unidades galactose e 2-O-metilgalactose pertencente à série D-; já as unidades de 3,6-anidrogactose são principalmente pertencentes a série L- (7,7%) e somente 2,2% são da série D-.

**TABELA-4 ANÁLISE QUÍMICA E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO C2S, SOLÚVEL EM KCl 2M DE *C. crenulata*.**

Fração	Sulfato <sup>a</sup> (%)	Ác. Pirúvico (%)	Monossacarídeos (mol %)						
			Gal <sup>b, c</sup>	AG <sup>d</sup>	2AG <sup>d</sup>	2Gal <sup>c</sup>	4Gal <sup>e</sup>	6Gal	Xil
			D - L	D - L	L	D - L			
C2S	27,7	3,7	62,0-10,6	2,2 -7,7	6,4	4,7 -1,7	1,6	tr.	3,1

<sup>a</sup>Expresso como NaSO<sub>3</sub>.

<sup>b</sup>Abreviatura dos monossacarídeos (Gal = galactose; AG = 3,6-anidrogactose; 2AG = 3,6-anidro-2-O-metilgalactose; 2Gal = 2-O-metilgalactose; 4Gal = 4-O-metilgalactose; 6Gal = 6-O-metilgalactose e Xil = xilose).

<sup>c, d</sup>As análises enantioméricas das unidades de galactose e de seus derivados monometilados foram realizados pelo método de CASES et al. (1995), e das unidades anidrogactosídicas pelo método de ERREA et al.(1998), respectivamente.

<sup>e</sup>Determinado após hidrólise ácida total, redução com borodeutereto de sódio e análise por CG-EM.  
tr.= traços (quantidades menores que 1).

Com a finalidade de se purificar o material solúvel em KCl 2M, a fração C2S foi submetida à cromatografia de troca iônica, em coluna de DEAE-Sephacel,

utilizando como eluentes: água e soluções crescentes de NaCl (0,25 - 1,5M). Deste fracionamento foram obtidas as frações: C2S-1, C2S-2, C2S-3 e C2S-4, as quais foram eluídas com água e solução de NaCl 0,5; 1,0 e 1,5M, respectivamente.

As frações C2S-1 - C2S-4 apresentaram na sua composição principalmente galactose e em menor proporção 3,6-anidrogactose, 3,6-anidro-2-O-metilgalactose, 2-O-metilgalactose e xilose. As únicas frações que apresentam 6-O-metilgalactose são a C2S-1 e a C2S-4, unidades de glucose foram encontradas somente na fração C2S-2. Glucose presente na composição monossacarídica de algumas galactanas pode ser proveniente da contaminação do amido das florídeas (USOV, 1992).

**TABELA-5 ANÁLISE QUÍMICA E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS SUB-FRAÇÕES DE C2S, DE *C. crenulata*.**

Fração	Sulfato <sup>a</sup> (%)	Ac. Pirúvico (%)	Monossacarídeos (mol %)						
			Gal <sup>b,c</sup>	AG <sup>d</sup>	2AG	2Gal <sup>c</sup>	6Gal	Xil	Glc
			D - L	D - L		D - L			
C2S-1	20,1	n.d.	72,8	7,6 - 0,9	6,9	7,5	1,1	3,2	-
C2S-2	25,1	1,9	71,5	3,9 - 2,4	6,7	6,2	-	8,2	1,1
C2S-3	28,3	0,5	62,5 - 5,9	4,7 - 11,1	8,6	3,2 - 1,3	-	2,7	-
C2S-4	17,5	n.d.	73,9	5,7 - 3,9	9,5	2,4	4,6	-	-

<sup>a</sup>Expresso como NaSO<sub>3</sub>.

<sup>b</sup>Abreviatura dos monossacarídeos (Gal = galactose; AG = 3,6-anidrogactose; 2AG = 3,6-anidro-2-O-metilgalactose; 2Gal = 2-O-metilgalactose; 6Gal = 6-O-metilgalactose; Xil = xilose e Glc = glucose).

n.d.= não determinado.

<sup>c, d</sup>As análises enantioméricas das unidades de galactose e de seus derivados monometilados foram realizados pelo método de CASES et al. (1995), e das unidades anidrogactosídicas pelo método de ERREA et al. (1998), respectivamente.

A fração de maior rendimento C2S-3, apresentou perfil homogêneo pela análise de HPSEC-MALLS e apresentou massa molecular média (M<sub>w</sub>) de 236.200

Da, a qual foi determinada baseando-se na variação dos índices de refração ( $dn/dc = 0,077$ ).

Considerando a homogeneidade da fração e a análise enantiomérica das unidades monossacarídicas constituintes, (Tabela-5) esta galactana C2S-3 foi classificada como do tipo DL-híbrida (ZIBETTI, 2001).

#### 4.1.2- ANÁLISES GERAIS DE C2S-3

De acordo com as análises realizadas (Tabela-6), podemos observar que esta galactana homogênea C2S-3 apresenta rotação óptica de  $+23,5^\circ$ . Apesar desta galactana apresentar rotação óptica positiva, este valor é baixo quando comparados aos valores de rotação óptica específica em torno de  $+70^\circ$ , para galactanas do tipo carragenana (ESTEVEZ et al., 2001). O valor da rotação óptica específica desta galactana, está de acordo com a presença de unidades B pertencentes tanto à série L- como D-, como determinado pelas análises enantioméricas dos monossacarídeos constituintes (Tabela-6). Ainda, ao observarmos o arranjo estrutural clássico das galactanas, onde toda as suas unidades A ( $\beta$ -galactopirranose) são pertencentes à série D-, e as unidades B ( $\alpha$ -galactopirranose) podem ser D- quando se tratar de carragenanas, e L- para as agarana, espera-se para as carragenanas somente a presença de unidades D- e para as agaranas espera-se uma relação de D-:L- de 1:1. A análise enantiomérica de C2S-3 mostra uma proporção de unidades D:L de 1:0,4 caracterizando a galactana como do tipo DL-híbrida.

A galactana C2S-3 apresenta alto teor de sulfatação (28,3%), além de substituição por acetal de ácido pirúvico 0,5% pela análise colorimétrica, (semiquantitativa). O grau de substituição por grupos sulfato em outras galactanas de algas da ordem Halymeniales esta na média de 25%, sendo que em *Kallymenia reniformis* e *Pachymenia carnososa* são observadas as maiores porcentagens (37 e 32,5%, respectivamente) (CHOPIN et al., 1994).



**TABELA-6 ANÁLISE QUÍMICA E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA GALACTANA C2S-3, C2S-3D E C2S-3T DE *C. crenulata*.**

Fração <sup>a</sup>	Sulfato <sup>b</sup> (%)	Ác. Pirúvico (%)	[α] <sup>20</sup> <sub>D</sub>	Monossacarídeos (mol %)									
				Gal <sup>c,d</sup>			AG <sup>e</sup>			2AG <sup>e</sup>	2Gal <sup>d</sup>		Xil
				D	-	L	D	-	L	L	D	-	
C2S-3	28,3	0,5	+23,5	62,5 – 5,9			4,7 – 11,1			8,6	3,2 – 1,3		2,7
C2S-3D	7,1	n.d.	n.d.	74,4			12,4			6,8	4,5		1,9
C2S-3T	n.d.	n.d.	n.d.	56,5 – 1,0			14,3 – 12,4			9,2	3,1		2,5

<sup>a</sup>Galactana nativa (C2S-3), dessulfatada (C2S-3D) e submetida a tratamento alcalino (C2S-3T).

<sup>b</sup>Expresso como NaSO<sub>3</sub>.

<sup>c</sup>Abreviatura dos monossacarídeos (Gal = galactose; AG = 3,6-anidrogallactose; 2AG = 3,6-anidro-2-O-metilgalactose; 2Gal = 2-O-metilgalactose e Xil = Xilose).

<sup>c, d</sup>As análises enantioméricas das unidades de galactose e de seus derivados monometilados foram realizados pelo método de CASES et al. (1995), e das unidades anidrogallactosídicas pelo método de ERREA et al. (1998), respectivamente.

n.d. = não determinado.

#### 4.1.3- DESSULFATAÇÃO SOLVOLÍTICA DA GALACTANA C2S-3

O processo de dessulfatação de galactanas de algas vermelhas é importante, para que se possa determinar a localização destes grupos substituintes no polissacarídeo original. A determinação do posicionamento dos grupos sulfato se dá através da análise comparativa da análise de metilação da galactana nativa e dessulfatada. Além do mais este processo solvolítico possibilita uma simplificação do espectro de RMN de <sup>13</sup>C, já que os espectros de galactanas com alto teor de sulfato geralmente são complexos e de difícil interpretação.

De acordo com a metodologia de solvólise de Nagasawa et al. (1979), primeiramente o polissacarídeo é transformado em sal de piridônio, para então ser solubilizado em uma mistura reativa (DMSO: metanol: piridina) e aquecida a 100°C.

A fração C2S-3 (28,3% de NaSO<sub>3</sub>) foi submetida a tratamento solvolítico, por 4 horas, e foi então denominada de C2S-3D (96% de rendimento). A determinação

do teor de sulfato (DODGSON, 1961) de C2S-3D foi de 7,1% de NaSO<sub>3</sub>, condizente com um grau de dessulfatação de 75%.

A remoção dos grupos sulfato pode levar a uma degradação dos polissacarídeos, e assim pode-se obter polímeros com uma maior ou menor degradação, principalmente das ligações mais lábeis, como as anidrogalactosídicas.

De acordo com a Tabela-6, o tratamento solvolítico não modificou significativamente a composição monossacarídica da fração. Entretanto, podemos observar uma pequena diminuição na porcentagem das unidades anidrogalactosídicas.

#### **4.1.4- TRATAMENTO ALCALINO DA GALACTANA C2S-3**

Com a finalidade de se quantificar as unidades precursoras de 3,6-anidrogalactose, ou seja, as unidades de  $\alpha$ -galactose 6-sulfato com hidroxilas livres em C-3 (galactose-6-sulfato, galactose-2,6-dissulfato e 2-O-metilgalactose 6-sulfato) as galactanas sulfatadas são submetidas a um meio alcalino (NaOH 1M), onde as unidades precursoras são convertidas a seus respectivos derivados de 3,6-anidrogalactose. Desta forma este tratamento promove uma dessulfatação seletiva em C-6 das unidades de  $\alpha$ -galactose (NOSEDA; CEREZO, 1995).

O tratamento alcalino da galactana C2S-3 foi conduzido a 80 °C por 5 horas, o teor de 3,6-anidrogalactose foi acompanhado pelo método do resorcinol (YAPHE, 1960), até que a quantidade de 3,6-anidrogalactose permanecesse constante. Após este tratamento químico a galactana foi denominada de C2S-3T (rendimento de 60%).

A determinação da composição monossacarídica, e a análise enantiomérica das unidades que compõem a fração C2S-3T (Tabela-6) mostraram um aumento de 3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactose (4,7%  $\rightarrow$  14,3%) em relação ao enantiômero L- (11,0%  $\rightarrow$  12,4%). Portanto aliando o processo de tratamento alcalino à análise enantiomérica das unidades de 3,6-anidrogalactose neste polímero, foi possível

determinar que a fração C2S-3 apresenta 7,6% de unidades de  $\alpha$ -D-galactose 6-sulfato e 3,3% de  $\alpha$ -L-galactose 6-sulfato.

#### **4.1.5- ANÁLISE DE (TRIDEUTERO)METILAÇÃO DA GALACTANA NATIVA (C2S-3), DESSULFATADA (C2S-3D) E SUBMETIDA A TRATAMENTO ALCALINO (C2S-3T)**

Devido à presença de monossacarídeos naturalmente metilados (3,6-anidro-2-O-metilgalactose e 2-O-metilgalactose) (Tabela-6) a fração C2S-3 nativa e parcialmente dessulfatada (C2S-3D) foram submetidas à metilação utilizando-se iodeto de metila deuterado ( $\text{ICD}_3$ ), como agente metilante. A fração C2S-3T, produto do tratamento alcalino de C2S-3, foi metilada usando  $\text{CH}_3\text{I}$ .

Previamente ao processo de (trideutero)metilação pelo método CIUCANU e KEREK (1984), as galactanas C2S-3, C2S-3D e C2S-3T foram tratadas com trietilamina (STEVENSON; FURNEAUX, 1991), com a finalidade de se obter os respectivos polissacarídeos na forma de sal de trietilamônio, os quais são solúveis no solvente (DMSO) utilizado no processo de metilação.

Os resultados das análises de (trideutero)metilação estão apresentados na Tabela-7, e na Tabela-8 os resultados da análise por CG-EM dos produtos de hidrólise das galactanas C2S-3 e C2S-3D trideuterometiladas.

As unidades A ( $\beta$ -D-galactopirranose) desta galactana são principalmente sulfatadas em C-2 devido à presença de 31,4 mol% de 4,6-Gal (Tabela-7). Uma menor proporção (9,8 mol%) de galactose 2,6-substituídas e não substituídas (3,0 mol%), também são observadas. A análise de metilação do polímero dessulfatado confirmou a presença majoritária de grupos sulfato em C-2, bem como que parte das unidades 2,6-di-O-substituídas correspondem a unidades de  $\beta$ -D-galactopirranose 2-sulfato xiloglicosiladas em C-6, devido à presença do derivado 2,4- $\text{CD}_3\text{Gal}$  (Tabela-8) na trideuterometilação da galactana dessulfatada.

Observamos ainda na Tabela-7 a presença de 2,5 mol% de galactose, que pode ser representativo de unidades A sulfatadas em C-2 e substituída nos carbonos 4 e 6 pelo acetal de ácido pirúvico (para cada 40 unidades

monossacarídicas 1 é piruvatada). Esta substituição é confirmada pela presença do derivado 2-CD<sub>3</sub>Gal (2,4 mol%) na trideuterometilação da galactana dessulfatada (Tabela-8).

**TABELA-7 ANÁLISE DE METILAÇÃO DAS GALACTANAS C2S-3, C2S-3D E C2S-3T.**

Derivado <sup>a</sup>	C2S-3	C2S-3D	C2S-3T
<i>Unidades A</i>			
2,4,6-Gal	3,0	42,6	4,0
4,6-Gal	31,4	2,0	33,7
2,4-Gal	-	2,0	
4-Gal <sup>b</sup>	9,8	-	9,0
Gal	2,5	-	2,5
<i>Unidades B</i>			
2,3,6-Gal	7,5 <sup>c</sup>	23,4 <sup>c</sup>	7,7
2,3-Gal	13,2 <sup>c</sup>	-	-
3-Gal <sup>b</sup>	2,4	-	-
2AG	12,1 <sup>c</sup>	23,6 <sup>c</sup>	24,2
AG	13,6	2,0	16,0
<i>Unidades A e/ou B</i>			
2,6-Gal	2,2	-	-
2-Gal	-	2,4	-
<i>Unidades terminais</i>			
2,3,4-Xil	2,3	2,0	2,9
2,3,4,6-Gal	-	-	-

<sup>a</sup>Mol% de monossacarídeo contendo grupos metil ou trideuterometil nas posições indicadas.

<sup>b</sup>Determinado após hidrólise ácida, redução com NaBD<sub>4</sub> e acetilação. A proporção relativa de 4- e 3-Gal foi determinada usando os fragmentos (*m/z*) 132 and 133, respectivamente.

<sup>c</sup>Análise de CG-EM mostrou grupo metil natural em C-2.

Em resumo, C2S-3 apresenta a maioria das suas unidades A (91%) sulfatadas em C-2, representadas por unidades de β-galactose 2-sulfato, β-

galactose 2,6-dissulfato,  $\beta$ -galactose 2-sulfato 6-xilosil e 4,6-O-(1'-carboxietilideno)- $\beta$ -D-galactose 2-sulfato. Os 9% restantes das unidades A são não sulfatadas ( $\beta$ -galactopirranose).

Com relação às unidades B da fração C2S-3, podemos observar na Tabela-7 a presença de 7,5 mol% do derivado 2,3,6-Gal na metilação da galactana nativa. A análise por CG-EM (Tabela-8) demonstrou que parte deste derivado (4,5 mol%) é proveniente de unidades não substituídas, devido a presença do derivado 2,3,6-CD<sub>3</sub>Gal, e que o restante (3,0 mol%) são substituídas por grupo metil em C-2 (2Me-3,6-CD<sub>3</sub>Gal). Esta galactana é também constituída por unidades B substituídas em C-6, devido a presença de 13,2 mol% do derivado 2,3-Gal, presente na metilação do polímero nativo (Tabela-7). Parte destas unidades sulfatadas em C-6 (2,3 mol%) são naturalmente metiladas em C-2, como comprovado pela presença do derivado 2Me-3-CD<sub>3</sub>Gal entre os produtos de hidrólise do polissacarídeo permetilado (Tabela-8). A presença do derivado 3-CD<sub>3</sub>Gal (Tabela-8) demonstra que 2,4 mol% das unidades B são substituídas em C-6 e C-2 por grupos sulfato. Estas substituições foram confirmadas pela análise de metilação comparativa do polímero nativo e dessulfatado.

Com relação às unidades de 3,6-anidrogactose, observamos na Tabela-7 a presença de 13,6 mol% do derivado AG entre os produtos de hidrólise do polímero nativo permetilado. A metilação da galactana dessulfatada confirmou que este derivado corresponde a unidades de 3,6-anidrogactose 2-sulfato (11,4 mol%), desde que entre os produtos de hidrólise do polímero dessulfatado foi observado um aumento proporcional do derivado 2AG (12,1→23,6 mol %). A baixa porcentagem (2 mol%) de AG observado na galactana C2S-3D, pode ser correspondente a unidades anidrogactosídicas que não foram dessulfatadas durante o processo de solvólise.

**TABELA-8 TRIDEUTEROMETILAÇÃO DA GALACTANA NATIVA C2S-3 (N) E DA PARCIALMENTE DESSULFATADA (D).**

Derivado	Composto por	Unidade Correspondente		%		(m/z) <sup>a</sup>
		N	D	N	D	
2,4,6-Gal	2,4,6-CD <sub>3</sub> Gal	G	G + G2S + G2,6S	3,0	42,6	
4,6-Gal	4,6-CD <sub>3</sub> Gal	G2S	G2S / G2R	31,4	2,0	
2,4-Gal	2,4-CD <sub>3</sub> Gal		G2S6X	-	2,0	
4-Gal <sup>b</sup>	4-CD <sub>3</sub> Gal	G2,6S + G2S6X		9,8	-	132, 192
2-Gal	2-CD <sub>3</sub> Gal		GP2S	-	2,4	
Gal	Gal	GP2S		2,5	-	
2,3,6-Gal	2,3,6-CD <sub>3</sub> Gal	D / L	D / L + D6S + L6S + D2,6S / L2,6S	4,5	17,8	107, 120, 167
	2Me-3,6-CD <sub>3</sub> Gal	D2M / L2M	D2M / L2M + L2M6S / D2M6S	3,0	5,6	104, 117, 164
2,3-Gal	2,3-CD <sub>3</sub> Gal	D6S <sup>c</sup>		7,6	-	107, 120, 167
		L6S <sup>c</sup>		3,3	-	
	2Me-3-CD <sub>3</sub> Gal	L2M6S / D2M6S		2,3	-	104, 117, 164
3-Gal <sup>b</sup>	3-CD <sub>3</sub> Gal	D2,6S / L2,6S		2,4	-	133, 193
2AG	2-CD <sub>3</sub> AnGal	DA	DA + LA2S / DA2S	3,5	14,9	120
	2Me-AnGal	LA2M	LA2M	8,6	8,7	117
AG	AG	LA2S / DA2S	LA2S / LA2R / DA2S / DA2R	13,6	2,0	
2,6-Gal	2,6-CD <sub>3</sub> Gal	G4S / D3S / L3S		2,2	-	
2,3,4-Xyl	2,3,4-CD <sub>3</sub> Xyl	X	X	2,3	2,0	

CD<sub>3</sub> = Trideuterometil;

<sup>a</sup>Fragmentos usados para determinar as proporções relativas dos alditóis acetato parcialmente metilados e parcialmente trideuterometilados.

<sup>b</sup>Determinado após hidrólise ácida, redução com NaBD<sub>4</sub>, acetilação e análise em CG-EM.

<sup>c</sup>As indicações enantioméricas foram baseadas nas análises enantioméricas do conteúdo de 3,6-anidrogactose na galactana nativa e na submetida a tratamento alcalino.

(/ = e/ ou, - = não detectado).

A análise por CG-EM do polímero dessulfatado confirmou que o derivado 2AG é composto tanto por 2-CD<sub>3</sub>AnGal (14,9 mol%) quanto por 2Me-AnGal (8,7 mol%) (Tabela-8). Este resultado confirma, que aproximadamente metade das unidades 3,6-anidrogactosídicas na galactana C2S-3 são sulfatadas em C-2 e a outra metade, são naturalmente metiladas em C-2 ou não substituídas neste carbono.

O tratamento alcalino de C2S-3 (fração C2S-3T), como discutido anteriormente, mostrou um aumento principal de 3,6-anidro- $\alpha$ -D-galactose (4,8%  $\rightarrow$  12,4%) e um pequeno aumento do enantiômero L- (11,0%  $\rightarrow$  14,3%) (Tabela-6). De acordo com a proporção total de unidades  $\alpha$ -galactose 6-sulfato na galactana nativa (C2S-3), 7,6% destas unidades pertencem a série D- e 3,3% a L-. Um pequeno aumento foi observado na metilação de C2S-3T do derivado 3,6-anidrogactose, de acordo com a proporção obtida de 2,4% na trideuterometilação do polímero nativo (2,4% de  $\alpha$ -galactose 2,6-dissulfato). Quanto ao derivado 3,6-anidro-2-O-metilgalactose é possível observar que este derivado permaneceu constante após o tratamento alcalino (Tabela-6), de acordo com este resultado a trideuterometilação da galactana nativa, mostra a presença de pequena quantidade de 2-O-metilgalactose 6-sulfato (2,3 mol% de 2Me-CD<sub>3</sub>Gal, Tabela-8).

Em resumo, as unidades B ( $\alpha$ -galactose) são mais heterogêneas quando comparado às unidades A, são compostas por unidades de galactose não substituídas, unidades metiladas em C-2, sulfatadas em C-6, unidades de 3,6-anidrogactose, a qual pode estar sulfatada ou metilada em C-2 ou ainda não-substituídas.

#### **4.1.6- ESPECTROSCOPIA DE RMN DE <sup>13</sup>C DAS FRAÇÕES C2S-3, C2S-3D.**

Antes de apresentar os resultados espectroscópicos de RMN de <sup>13</sup>C destas galactanas, é importante ressaltar que os espectros obtidos de galactanas extraídas da ordem Halymeniales relatados na literatura são complexos e de difícil

interpretação. Algumas vezes somente o espectro da galactana dessulfatada pode ser interpretado (SEN et al., 2002).

Comparando os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  da fração nativa (C2S-3) e do seu respectivo polímero dessulfatado (C2S-3D) (Figura-4, p. 67), observamos que a dessulfatação modificou alguns sinais.

O espectro da galactana nativa (C2S-3), apresenta poucos sinais na região anomérica quando comparado ao grande número de derivados metilados obtidos na metilação desta fração. Assim, estes deslocamentos químicos podem representar a sobreposição de sinais correspondentes a mais que uma unidade monossacarídica. O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da galactana C2S-3 apresenta sinais na região anômérica em 102,6 e 98,7 ppm, correspondentes a unidades de  $\beta$ -galactopirranose ligadas a 3,6-anidro-2-O-metil- $\alpha$ -L-galactose (LAHAYE et al., 1989). Adicionalmente a região anômérica apresenta sinal em 101,1 ppm atribuído a unidades de  $\beta$ -galactose 2-sulfato ligadas a  $\alpha$ -D-galactose (6-sulfatada ou não) sinal em 96,1 ppm. Este último deslocamento químico pode ser atribuído também ao C-1 de unidades de 3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactose 2-sulfato (MILLER; BLUNT, 2000).

Embora a porcentagem de unidades A piruvatadas seja baixa, foi possível observar tanto no espectro de C2S-3 quanto no de C2S-3D, a presença em campo mais alto do deslocamento químico em 25,0 ppm, referente ao grupo metil ( $\text{CH}_3$ -) de acetal de ácido pirúvico. Já o sinal correspondente ao grupo carbonila deste substituinte (175,7 ppm), foi observado apenas no espectro da galactana nativa (GAREGG et al., 1979; CHIOVITTI et al., 1997).

Geralmente a ressonância do carbono acetálico de ácido pirúvico em 101,6 ppm, não é observado no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , de galactanas de algas vermelhas. Segundo GORIN et al. (1982), o tempo de relaxamento ( $T_1$ ) do carbono acetálico quaternário pode impedir a sua detecção por espectroscopia de RMN de  $^{13}\text{C}$ , mesmo quando este substituinte está presente em uma quantidade significativa. Este sinal pode também estar sobreposto a outros sinais na região anômérica.

De acordo com GAREGG et al. (1979), o sinal do grupo metil de acetal de ácido pirúvico em 25,0 ppm, corresponde a configuração R do acetal. É



importante ressaltar que em polissacarídeos de algas vermelhas só foi encontrado este substituinte na configuração R.

No espectro da galactana C2S-3, é facilmente localizado fora da região anomérica um sinal em 78,0 ppm correspondente a C-2 sulfatado, que desaparece no espectro do polímero dessulfatado (C2S-3D), confirmando os resultados de metilação onde as unidades A são majoritariamente substituídas em C-2 por grupos sulfato em C-2.

Apesar do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da fração dessulfatada apresentar uma baixa qualidade, devido ao aumento da linha de base, foi possível determinar a presença de sinais correspondentes a unidades de:

- (1)  $\beta$ -galactopiranoose (C-1 – C-6: 102,2; 70,0; 81,8; 68,4; 74,9; 60,9 ppm) ligadas a 3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactose (C-1 – C-6: 97,8; 69,4; 79,7; 77,3; 75,3; 69,0 ppm) (LAHAYE et al., 1989);
- (2)  $\beta$ -galactopiranoose (C-1 – C-6: 102,2; 70,0; 82,3; 68,4; 74,9; 60,9 ppm) ligadas a 3,6-anidro-2-O-metil- $\alpha$ -L-galactose (C-1 – C-6: 98,3; 78,5; 78,1; 77,3; 75,3; 69,0 ppm) (LAHAYE et al., 1989), além de
- (3)  $\beta$ -galactopiranoose (C-1 – C-6: 104,4; 70,0; 78,5; 65,2; 74,9; 60,9 ppm) ligadas a  $\alpha$ -D-galactopiranoose (C-1 – C-6: 95,8; 69,0; -; 78,1; 70,0, 60,9 ppm) (USOV et al., 1980).

No espectro de C2S-3D foi possível ainda observar a presença dos sinais em 65,2 e 66,4 ppm, atribuídos ao C-6 e ao C-5 de 4,6-O-(1'-carboxietilideno)- $\beta$ -D-galactopiranoose. Estas unidades piruvatadas podem estar ligadas a 3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactose ou a 3,6-anidro-2-O-metil- $\alpha$ -L-galactose. Segundo MILLER (1998), a piruvatação da unidade A não interfere significativamente nos deslocamentos químicos dos carbonos das unidades B, quando estas unidades forem constituídas por unidades de 3,6-anidro-galactose (da série L- ou D-).

**TABELA - 9 SINAIS ANOMÉRICOS (ppm) PRESENTES NOS ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DAS FRAÇÕES C2S-3 E C2S-3D.**

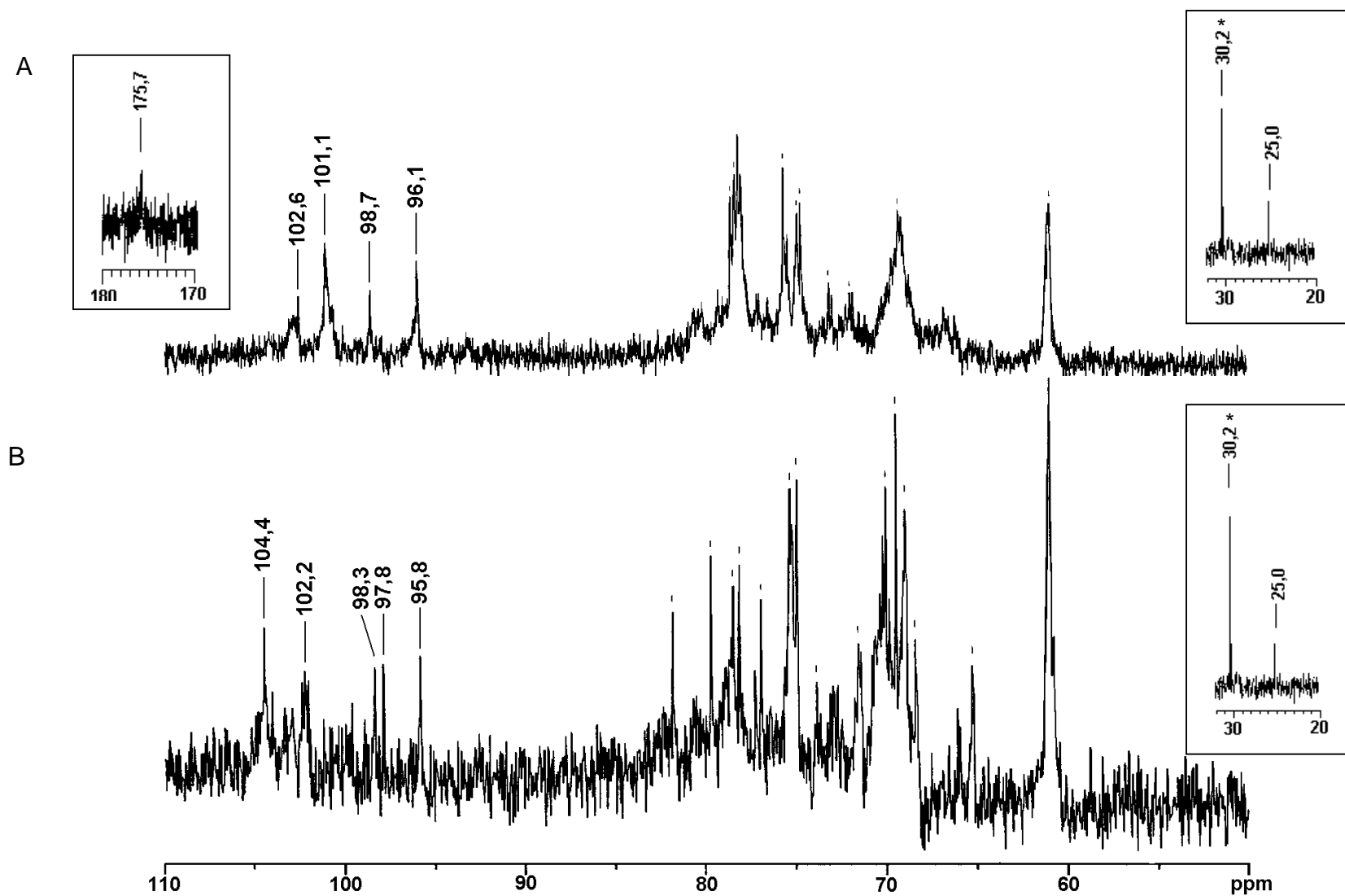
Díades	Unidade - A	Unidade – B
G $\rightarrow$ LA <sup>a</sup>	102,2	97,8
G $\rightarrow$ LA2M <sup>a</sup>	102,2	98,3
G $\rightarrow$ D <sup>a</sup>	104,4	95,8
G $\rightarrow$ LA2M <sup>b</sup>	102,6	98,7
G2S $\rightarrow$ D(6S) <sup>b</sup>	101,1	96,1
G2S $\rightarrow$ LA2S <sup>b</sup>	-	96,1

<sup>a</sup>Díades de C2S-3.

<sup>b</sup>Díades de C2S-3D.



FIGURA-4 ESPECTROS DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DAS GALACTANAS C2S-3(A) e C2S-3D (B).



Análise realizada à 60°C em  $\text{D}_2\text{O}$ , concentração das amostras 40 mg/mL.

\*Sinal correspondente à acetona utilizada como padrão interno ( $\delta = 30.2$  ppm).

#### 4.1.7- ESTUDO DA CINÉTICA DE CICLIZAÇÃO EM MEIO ALCALINO

De acordo com os resultados de metilação e de espectroscopia de RMN de  $^{13}\text{C}$  discutidos anteriormente, foi possível observar que a galactana C2S-3 apresenta algumas possibilidades estruturais para ciclização (díades ciclizáveis).

Como pode ser observado nas Tabelas-7 e -8, as unidades A de C2S-3 apresentam-se não sulfatadas e sulfatadas em C-2, numa proporção de 9% e 91%, respectivamente. As unidades B ciclizáveis de  $\alpha$ -galactose 2,6-dissulfato e  $\alpha$ -galactose 6-sulfato (ambas pertencentes a série D- e/ou -L), estão presentes numa proporção de 11% e 89%, respectivamente.

Estudos cinéticos prévios (NOSEDA et al., 2000), demonstraram que o caráter enantiomérico das unidades B não influenciam a velocidade de ciclização, ou seja a presença de unidades de  $\alpha$ -galactose 6-sulfato da série D- ou L- não afetam a cinética.

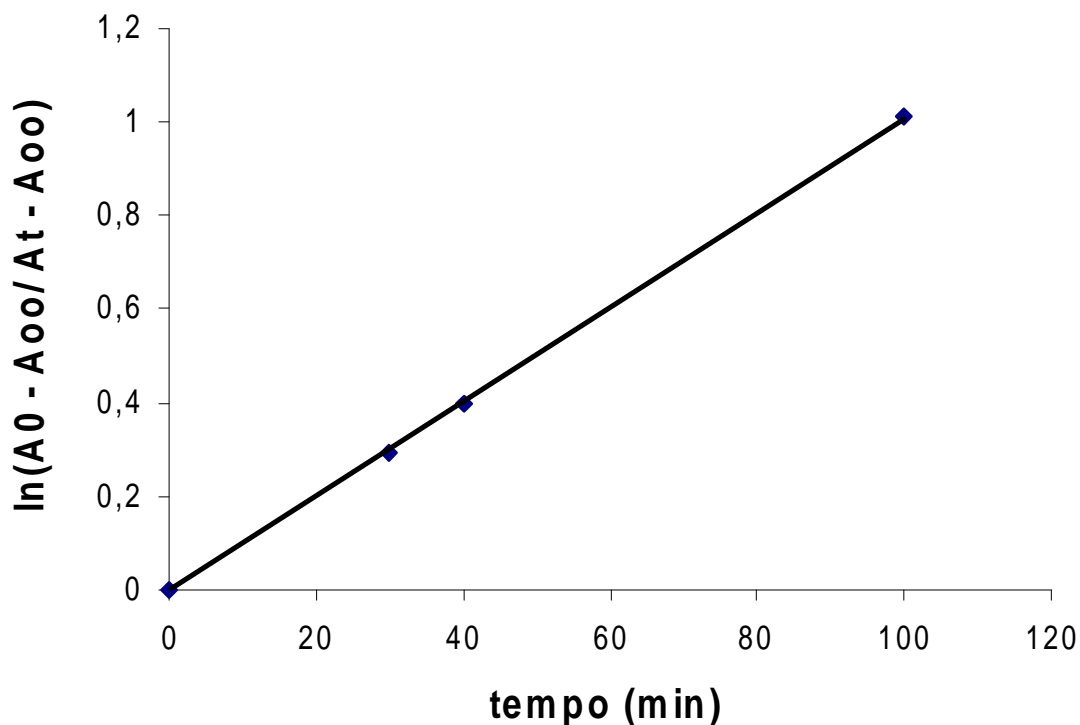
Desta forma a galactana C2S-3 pela presença de duas diferentes unidades A, e duas diferentes unidades B poderia apresentar quatro possíveis díades ciclizáveis ( $\beta$ -galactose 2-sulfato ligada a  $\alpha$ -galactose 2,6-dissulfato,  $\beta$ -galactose 2-sulfato ligada a  $\alpha$ -galactose 6-sulfato,  $\beta$ -galactose ligada a  $\alpha$ -galactose 2,6-dissulfato e  $\beta$ -galactose ligada a  $\alpha$ -galactose 6-sulfato). Estas díades determinam a constante (k) da velocidade da reação de ciclização alcalina, e o tempo de meia vida ( $t_{1/2}$ ), que se refere ao tempo necessário de reação para que metade das unidades de  $\alpha$ -galactose 6-sulfato sejam ciclizada em seus correspondentes derivados anidrogalactosídicos.

O estudo da cinética de ciclização alcalina da fração C2S-3 foi realizado a 80 °C, meio alcalino (NaOH 1M). Desta solução foram retiradas alíquotas em tempos determinados, e o aumento do teor de 3,6-anidrogalactose foi acompanhado pelo método do resorcinol (YAPHE, 1960). Através do gráfico (Figura-5) foi determinado a constante de velocidade da reação (k) com um valor de  $1,7 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  e o tempo de meia vida (68,6 minutos), Tabela-10.

Estes valores, quando comparados aos de outras galactanas, mostram uma

reação aproximadamente três vezes mais rápida que uma *lambda*-carragenana ( $\beta$ -D-galactose 2-sulfato  $\rightarrow$   $\alpha$ -D-galactose 2,6-dissulfato) (CIANCIA et al., 1993), porém mais lenta que uma porfirana ( $\beta$ -D-galactose  $\rightarrow$   $\alpha$ -L-galactose 6-sulfato) (NOSEDA et al., 2000) (Tabela-10, p.74). Assim na galactana C2S-3 de *C. crenulata* as unidades A não sulfatadas, como as presentes nas porfiranas aumentam a velocidade da reação de ciclização, enquanto as unidades A sulfatadas em C-2, como nas *lambda*-carragenanas diminuem a velocidade.

**FIGURA-5 DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE VELOCIDADE DA REAÇÃO DE CICLIZAÇÃO DA FRAÇÃO C2S-3 À 80°C.**



O tempo de meia vida da reação de ciclização alcalina foi calculado a partir da equação da reta obtida deste gráfico. Equação da reta ( $y = 0,0101x$ ), onde  $k = 0,0101$ , aplicando este valor na equação  $t_{1/2} = \ln 2/k$ , assim  $t_{1/2} = 68,6$  minutos.

Pela análise de RMN de  $C^{13}$  desta galactana, não foi possível definir se unidades de  $\beta$ -D-galactose e  $\beta$ -D-galactose 2-sulfato estavam ligadas a  $\alpha$ -galactose 6-sulfato ou a  $\alpha$ -galactose, desde que o sinal anomérico destas duas últimas unidades são iguais. Assim a determinação da velocidade de ciclização nesta galactana foi importante para confirmar que tanto unidades de  $\beta$ -D-galactose quanto de  $\beta$ -D-galactose 2-sulfato estão ligadas a unidades precursoras.

A força que dirige a ciclização das unidades precursoras de 3,6-anidrogallactose em meio alcalino é a ionização do HO-3 das unidades B. Nas díades que apresentam grupos sulfato em C-2 das unidades A (*C. crenulata* e *lambda*-carragenanas), a interação deste grupo sulfato com a hidroxila em C-3 (unidade B) é esperada, protegendo a ionização do grupo hidroxil e, assim, reduzindo a velocidade de ciclização. De modo diferente a presença de grupos sulfato em C-4 da unidade A (carragenanas da família *kappa*), apresentam uma reação de ciclização alcalina mais rápida (em torno de 20 a 60 vezes) que as carragenanas da família *lambda*. Portanto a presença de sulfato em C-4 acelera a reação de ciclização alcalina (CIANCIA et al., 1993).

Nas carragenanas a desestabilização da conformação em cadeira  ${}^4C_1$  da unidade B e a mudança para  ${}^1C_4$  é devido a repulsão entre as cargas negativas dos íons HO-2 e HO-3 das unidades de  $\alpha$ -D-galactose 6-sulfato ou do sulfato em C-2 e o íon HO-3 nas unidades de  $\alpha$ -D-galactose 2,6-dissulfato.

Recentemente VIANA et al. (2004) estudaram a cinética de ciclização de uma carragenana do tipo *iota/nu*-carragenana, com aproximadamente 21% da estrutura do tipo *nu*-carragenana (100% de díades ciclizáveis de  $\beta$ -D-galactose 4-sulfato ligada a  $\alpha$ -D-galactose 2,6-dissulfato). A cinética de ciclização desta galactana a 70 °C ( $t_{1/2}$ = 1,5 minutos), foi mais rápida que a de uma *mu/nu*-carragenana parcialmente ciclizada ( $t_{1/2}$ = 9,0 minutos a 70 °C) (CIANCIA et al., 1993). Este último tipo de galactana é constituído por aproximadamente 80% de  $\beta$ -D-galactose 4-sulfato ligada a  $\alpha$ -D-galactose 2,6-dissulfato e 20%  $\beta$ -D-galactose 4-sulfato ligada a  $\alpha$ -D-galactose 6-sulfato. Deste modo foi demonstrado que a presença de grupos sulfato em C-2 das unidades B, em carragenanas da família *kappa*, diminui o tempo de meia vida da reação de ciclização alcalina. A HO-2, por

ser mais ácida (LENZ, 1960; SUGIHARA, 1953) se ioniza primeiro dificultando assim a ionização da HO-3. Deste modo as unidades  $\alpha$ -D-galactose 6-sulfato são ciclizadas mais lentamente que as unidades  $\alpha$ -D-galactose 2,6-dissulfato.

Desta forma, os resultados obtidos para C2S-3 de *C. crenulata*, mostram a influência do sulfato em C-2 das unidades A, o que torna a ciclização mais lenta que a porfirana, porém mais rápida que uma *lambda*-carragenana. Embora o efeito da substituição por acetal de ácido pirúvico (substituindo os carbonos 4 e 6) sobre a velocidade de ciclização não tenha ainda sido investigada, é possível que tal substituínte exerça um efeito similar a sulfatação em C-4, observada nas *kappa*-carragenanas (CIANCIA et al., 1993). Deste modo a menor velocidade de ciclização de C2S-3, em relação a uma *lambda*-carragenana é explicada pela presença de unidades A sem sulfato em C-2.



**TABELA-10 CONSTANTE DA VELOCIDADE E TEMPO DE MEIA VIDA DA REAÇÃO DE CICLIZAÇÃO ALCALINA DE ALGUMAS DÍADES DE CARRAGENANAS E AGARANAS. <sup>a</sup>**

Temp. (°C)	Díades					
	G4S→D2,6S G4S→D6S <sup>b</sup>	G→L6S <sup>c</sup>	G→D2,6S <sup>d</sup>	G→D2,6S <sup>e</sup>	G2S→D(L)6S <sup>f</sup>	G2S→D2,6S <sup>g</sup>
80	26,0 (4,5)	4,9 (23,0)	4,8 (24,7)	3,2 (38,3)	1,7 (68,6)	0,67 (170)

<sup>a</sup> A constante de velocidade da reação (k) é dada em  $\times 10^4 \text{ s}^{-1}$  e o tempo de meia vida (em parênteses) em minutos.

<sup>b</sup> Amostra (1C<sub>3</sub>)(CIANCIA et al., 1993) *mu/nu*-carragenana parcialmente ciclizada, contendo aproximadamente 80% de G4S→D2,6S e 20% de G4S→D6S de díades ciclizáveis. <sup>c</sup> Porfirana de *Porphyra columbina* (NOSEDA et al., 2000). <sup>d</sup> Valores intermediários das frações T<sub>2(26)</sub> e T<sub>2(35)</sub> contendo estas díades provenientes da degradação de *lambda*-carragenana (NOSEDA; CEREZO, 1995). <sup>e</sup> Valores intermediários de um di- e em trissacarídeo, proveniente de hidrólise ácida parcial de *lambda*-carragenana, contendo estas díades (NOSEDA; CEREZO, 1995).

<sup>f</sup> Fração C2S-3 da galactana de *C. crenulata* contendo aproximadamente 70% de G2S→D6S e 30% de G2S→L6S.

<sup>g</sup> *Lambda*-carragenana (1T<sub>2</sub>) com 100% de G2S→D2,6S díades ciclizáveis (CIANCIA et al., 1993).

#### 4.1.8- DESPOLIMERIZAÇÃO DA GALACTANA C2S-3

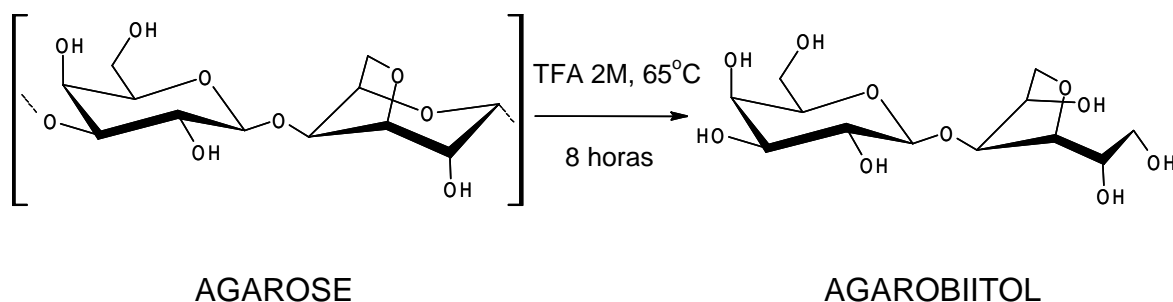
A obtenção de oligossacarídeos é uma ferramenta importante no estudo estrutural de polissacarídeos, tanto para a confirmação da seqüência das unidades monossacarídicas, quanto para determinar a configuração enantiomérica e tipo de ligação (PAINTER, 1983). Várias metodologias de hidrólise são observadas na literatura, como: o uso de enzimas específicas (glicosidases) (PAINTER, 1983), autohidrólise de carragenanas (NOSEDA; CEREZO, 1995), bem como a utilização de ácidos.

A presença típica de unidades de 3,6-anidrogactose nas galactanas de algas vermelhas, que são extremamente sensíveis à presença de ácidos (PAINTER, 1983), levou ao desenvolvimento de técnicas de hidrólise que protegessem este anidro-açúcar.

A hidrólise redutiva parcial, técnica desenvolvida por USOV e ELASHVILI (1991), vem sendo utilizada para a obtenção de oligossacarídeos sulfatados de algas vermelhas, pois esta hidrólise ácida ocorre na presença de 4-metil-morfolina borano (agente redutor estável em meio ácido), resultando numa quebra seletiva das ligações 3,6-anidrogactosídicas. Assim, os oligossacarídeos gerados apresentam em uma de suas extremidades unidades de 3,6-anidrogactitol (Figura-6).

A agarose (polímero constituído de díades repetitivas de  $\beta$ -galactopirranose  $\rightarrow$  3,6-anidro- $\alpha$ -L-gactose), quando submetida as condições de hidrólise redutiva parcial (TFA 2M, 65 °C por 8 horas), resulta unicamente na obtenção do dissacarídeo agarobiitol (Figura-6).

**FIGURA-6 ESTRUTURA DA AGAROSE E DO SEU PRODUTO DE HIDRÓLISE REDUTIVA PARCIAL AGAROBIITOL.**



Como pode ser observada na Figura-6, a hidrólise redutiva parcial de galactanas com estruturas repetitivas, como a da agarose, produz oligossacarídeos de baixa massa molecular, quando se utiliza as condições de hidrólise do método original (USOV; ELASHVILI, 1991).

Galactanas do tipo DL-híbridas quando submetidas a hidrólise redutiva parcial originam oligossacarídeos com estrutura de agarana e oligossacarídeos com estrutura de carragenana, ou seja, até o presente nenhum oligossacarídeo com estrutura DL-híbrida foi obtido. Considerando que as galactanas do tipo DL-híbridas apresentam-se constituídas por blocos de agaranas ligados a blocos de carragenanas, estatisticamente é baixa a probabilidade de obtenção de um oligossacarídeo proveniente da zona de junção entre os blocos.

Deste modo, com a finalidade de se obter um oligossacarídeo representativo da molécula original, ou seja, ainda mantendo a estrutura DL-híbrida, a fração C2S-3 foi submetida à hidrólise redutiva parcial, em condições mais brandas (TFA 1,5M, 65 °C por 6 horas) que as do método original (TFA 2M, 65 °C por 8 horas) (USOV; ELASHVILI, 1991).

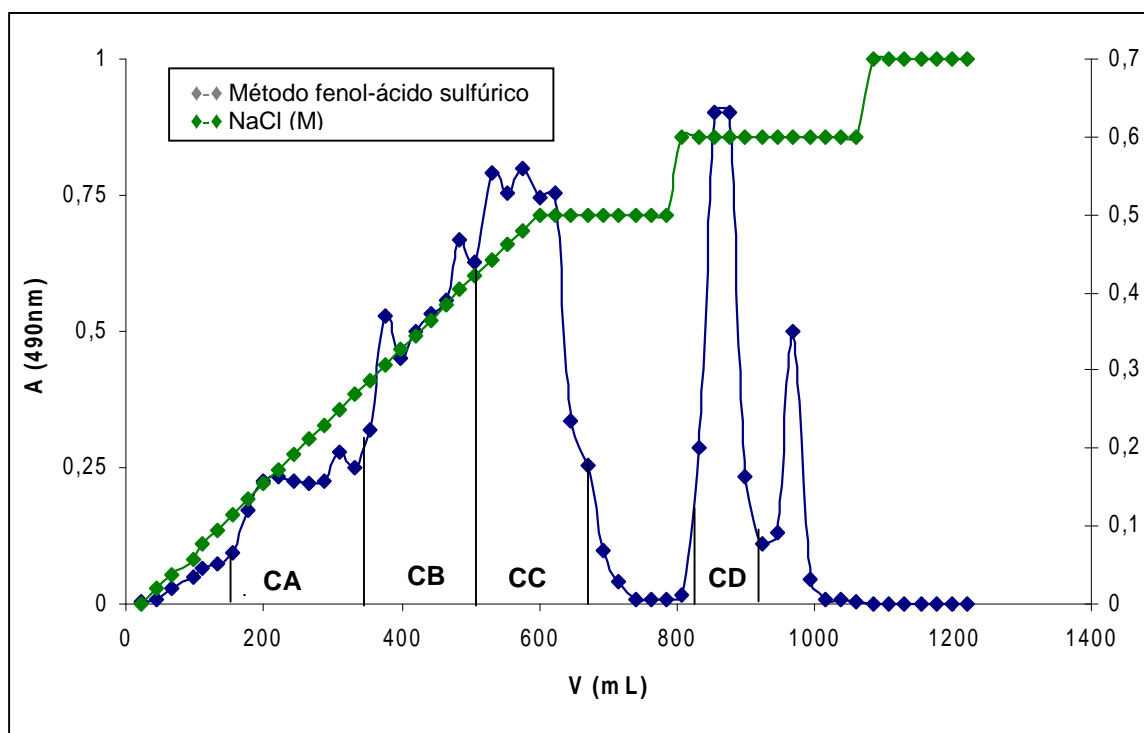
No presente trabalho, como esperado, foi obtida uma fração oligossacarídica com grau de polimerização elevado como descrito a seguir.

O material hidrolisado obtido foi submetido à cromatografia de troca-iônica em coluna de DEAE-Sephadex A-50, utilizando água destilada como eluente, para retirar o agente redutor (4-metil-morfolina borano) que é co-eluído com os açúcares neutros. Em seguida foi utilizado um gradiente contínuo de NaCl de 0 - 0,5M, e posteriormente um gradiente descontínuo de 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 e 1,0M de NaCl. Neste último tipo de eluição foi observado a presença de açúcar (teste de fenol-ácido sulfúrico) até 0,6M (Figura- 7).

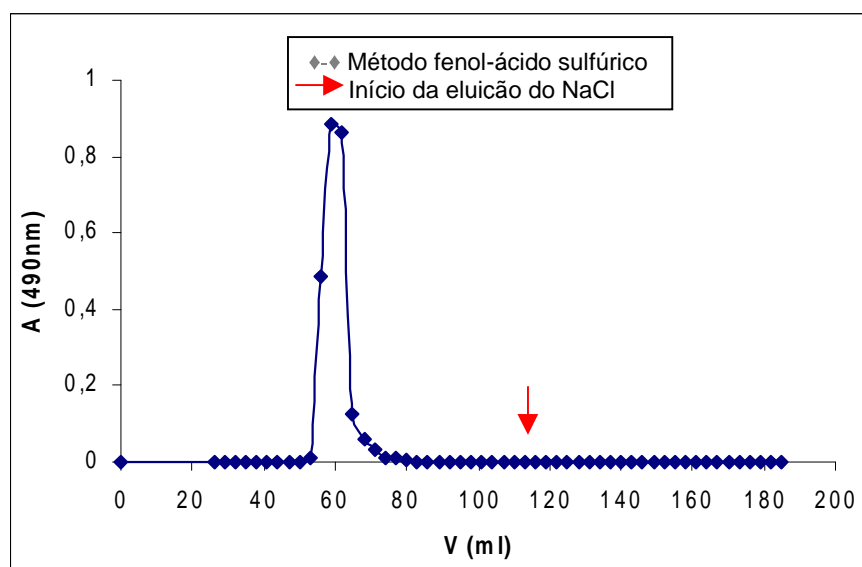
As frações obtidas CA, CB, CC e CD apresentavam grande quantidade de sal, e a solubilização deste material resultaria em um volume muito elevado para aplicação em cromatografia de gel-permeação. Assim, previamente estas frações foram tratadas com DMSO (3 vezes), seguido de precipitação com clorofórmio (3 volumes). Após evaporação do clorofórmio, as subfrações CC (maior rendimento) e CD foram submetidas à cromatografia de gel filtração em coluna de BioGel-P2. Como é possível observar no perfil cromatográfico de gel permeação (Figuras-8 e -9), as subfrações CC e CD eluíram no volume morto, indicando que foram excluídas do gel e conseqüentemente apresentam massa molecular superior a 1800 daltons (limite de exclusão do BioGel P-2). Nesta etapa cromatográfica foi removido o restante de sal contaminante.

Neste trabalho apenas a fração CC foi investigada.

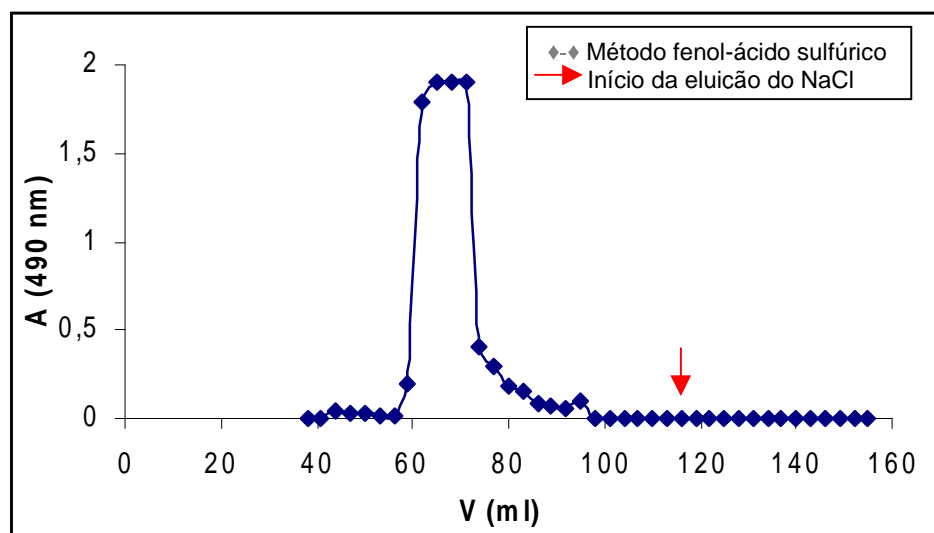
**FIGURA-7 PERFIL DE ELUIÇÃO DA CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA (DEAE-SEPHADEX A-25) PRODUTO DE HIDRÓLISE REDUTIVA PARCIAL DA FRAÇÃO C2S-3 DA ALGA *C. crenulata*.**



**FIGURA-8 PERFIL DA CROMATOGRAFIA DE GEL FILTRAÇÃO (BioGel-P2) DA FRAÇÃO CC.**

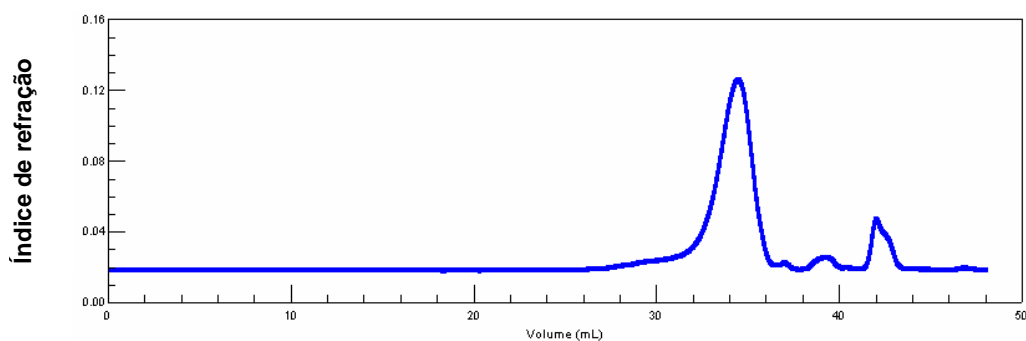


**FIGURA-9 PERFIL DA CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO (BioGel-P2) DA FRAÇÃO CD.**

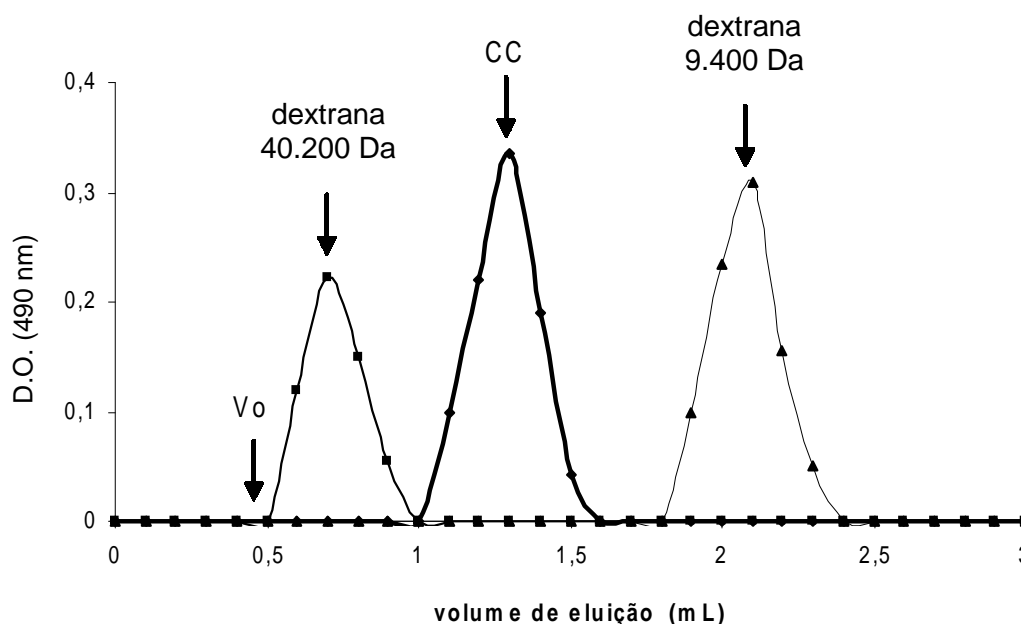


A principal sub-fração (CC, 25,3% de sulfato) apresentou um perfil homogêneo por HPSEC-MALLS e em coluna de BioGel P-30 padronizada (Figuras-10 e -11). A massa molecular calculada conforme a eluição dos padrões de dextrana, foi de 25.000 Da. A composição monossacarídica mostra que a fração CC contém galactose, 3,6-anidro- $\alpha$ -galactose e 3,6-anidro-2-O-metil- $\alpha$ -galactose além de 2-O-metilgalactose (Tabela-11).

**FIGURA-10 ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE DA FRAÇÃO CC POR CROMATOGRAFIA DE GEL PERMEAÇÃO (HPSEC-MALLS).**



**FIGURA-11 ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE DA FRAÇÃO CC POR CROMATOGRAFIA DE GEL PERMEAÇÃO (BioGel P-30).**



**TABELA-11 ANÁLISE DO TEOR DE SULFATO E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO CC PROVENIENTE DA HIDRÓLISE REDUTIVA PARCIAL DA GALACTANA C2S-3 DE *C. crenulata*.**

Fração	Sulfato <sup>a</sup> (%)	Monossacarídeos (mol %)			
		Gal <sup>b</sup>	AG	2AG	2Gal
CC	25,3	63,7	15,4	17,7	3,2

<sup>a</sup> Expresso como NaSO<sub>3</sub>.

<sup>b</sup> Abreviatura dos monossacarídeos (Gal = galactose; AG = 3,6-anidrogallactose; 2AG = 3,6-anidro-2-O-metilgalactose e 2Gal = 2-O-metilgalactose)

Comparando a análise da composição monossacarídica, da fração CC (Tabela-11) com o polímero de origem C2S-3 (Tabela-6, p. 59), podemos observar que o tratamento químico não provocou grandes alterações exceto pela ausência

de unidades de xilose e um aumento de aproximadamente duas vezes no teor das unidades de 3,6-anidro-2-O-metil- $\alpha$ -galactose.

A análise de metilação mostrou um padrão de complexidade similar ao observado para a galactana de origem C2S-3 (Tabela-12). A principal diferença encontrada na metilação de CC foi o aumento do derivado 2,4,6-Gal com um concomitante decréscimo de 4,6-Gal, de acordo com hidrólise de grupos sulfato em C-2 das unidades A.

A metilação mostrou ainda uma maior quantidade do derivado 2,3,6-Gal (7,5 – 13,3 mol%), com uma diminuição do derivado 2,3-Gal (13,2 - 9,2 mol%), mostrando que parte das unidades B, também perderam seus grupos sulfato em C-6 (Tabela-12).

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da fração CC (Figura –12, p. 83), mostra uma grande quantidade de sinais na região anomérica. Para a análise destes deslocamentos químicos foram necessários os dados de metilação previamente obtidos. O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da fração CC, apresenta sinais em 62,8, 83,0 e 86,2 ppm, correspondentes aos C-1, C-3 e C-4, respectivamente, de unidades anidrogalactosídicas reduzidas (USOV; ELASHVILI, 1991). Ainda é possível observar que algumas ligações anidrogalactosídicas não foram hidrolisadas pela presença do sinal de C-1 destas unidades em 98,7 ppm.

Os sinais em 24,9, 175,3 e 101,1 ppm correspondem aos carbonos metílico, carboxílico e acetálico de acetal de ácido pirúvico, respectivamente (GAREGG et al., 1979; GORIN et al., 1982). Enquanto os sinais 104,2 - 104,3 ppm podem, em parte, corresponder ao C-1 de unidades de  $\beta$ -D-xilose e/ou  $\beta$ -D-galactose ligadas ao C-6 das unidades A (USOV et al., 1997).

É possível observar também a presença de sinais em 66,8 ppm (correspondente a C-6 sulfatado) e 65,0 - 64,8 e 63,6 ppm (correspondente a C-6 e C-5 de  $\beta$ -D-galactose piruvatada). Deslocamentos químicos correspondendo a grupos metil de 3,6-anidro-2-O-metilgalactose (59,9 ppm) (LAHAYE et al., 1989) e de 2-O-metilgalactose (58,1 ppm) (USOV et al., 1997) também são observados.



Algumas díades também puderam ser identificadas e estão relatadas na tabela 12, nesta estão presentes díades de carragenana e de agarana mostrando que o caráter DL-híbrido permaneceu neste material despolimerizado.

Comparando as díades obtidas a partir do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de CC e da galactana de origem C2S-3, observamos que a fração despolimerizada mostrou a presença de díades que não eram observadas no espectro da galactana original C2S-3 (Tabela-13, p. 84).

**TABELA-12 ANÁLISE DE METILAÇÃO DA GALACTANA C2S-3 E DA FRAÇÃO CC.**

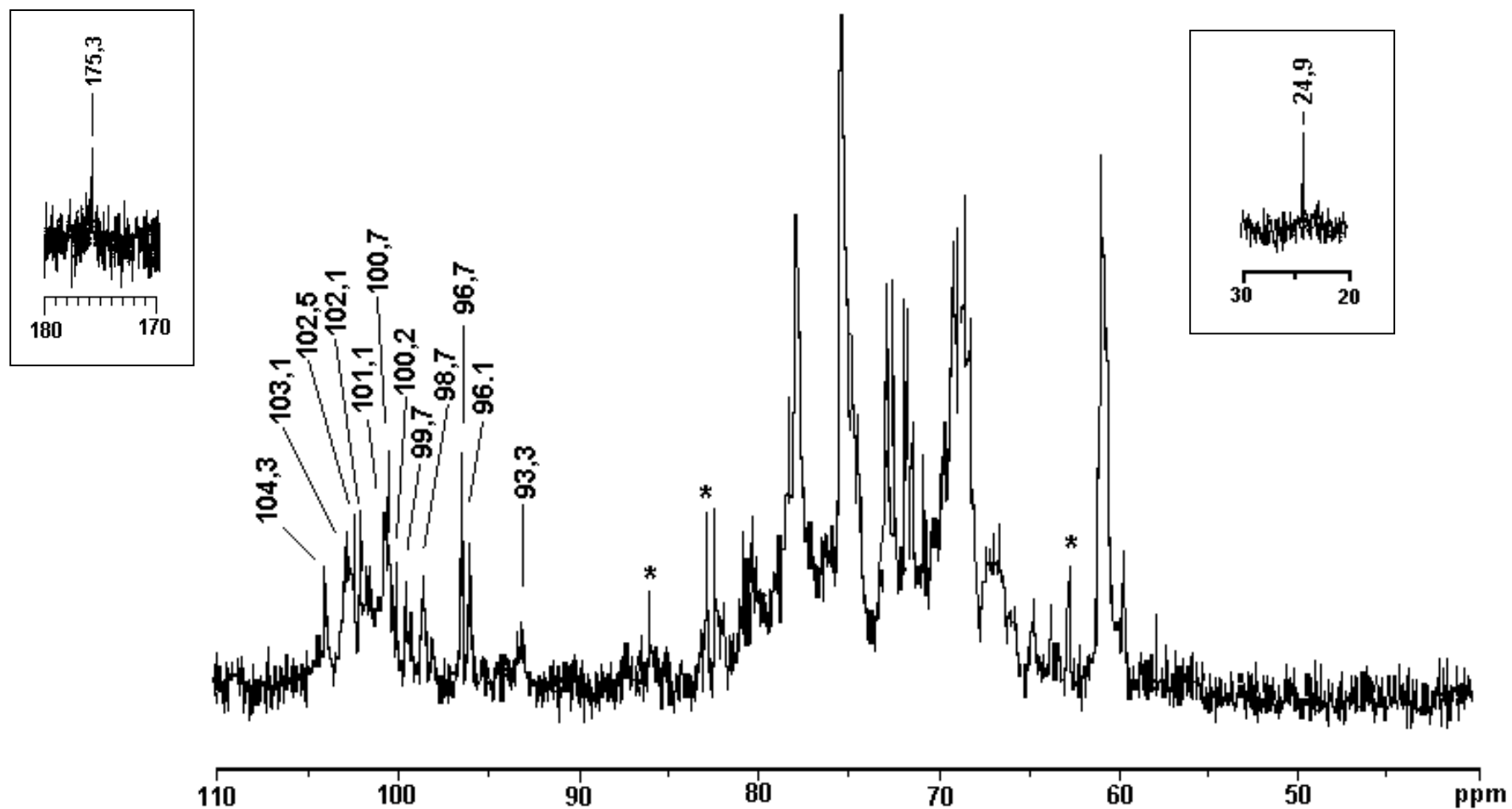
Derivado <sup>a</sup>	C2S-3	CC
<i>Unidades A</i>		
2,4,6-Gal	3,0	17,8
4,6-Gal	31,4	9,2
4-Gal <sup>b</sup>	9,8	4,7
Gal	2,5	7,5
<i>Unidades B</i>		
2,3,6-Gal	7,5 <sup>c</sup>	13,3
2,3-Gal	13,2 <sup>c</sup>	9,2
3-Gal <sup>b</sup>	2,4	-
2AG	12,1 <sup>c</sup>	10,8
AG	13,6	19,2
<i>Unidades A e/ou B</i>		
2,6-Gal	2,2	-
2-Gal	-	3,2
<i>Unidades terminais</i>		
2,3,4-Xil	2,3	2,4
2,3,4,6-Gal	-	2,7

<sup>a</sup>Mol% de monossacarídeo contendo grupos metil ou trideuterometil nas posições indicadas.

<sup>b</sup>Determinado após hidrólise ácida, redução com NaBD<sub>4</sub> e acetilação. A proporção relativa de 4- e 3-Gal foi determinada usando os fragmentos (*m/z*) 132 and 133, respectivamente.

<sup>c</sup>Análise de CG-EM mostrou grupo metil natural em C-2.

FIGURA –12 ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DA FRAÇÃO CC.



\*Sinais de C-1, C-3 e C-4 de 3,6-anidrogallactitol.

Análise realizada à 60°C em  $\text{D}_2\text{O}$ , concentração das amostras 40 mg/mL.

**TABELA - 13 SINAIS ANOMÉRICOS (ppm) PRESENTES NOS ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DAS FRAÇÕES C2S-3 E CC.**

Díades	Unidade - A	Unidade – B
G $\rightarrow$ LA2M <sup>a</sup>	102,6	98,7
G2S $\rightarrow$ D(6S) e/ou LA2S <sup>a</sup>	101,1	96,1
G $\rightarrow$ D2M	104,3	93,3
G $\rightarrow$ D	104,3	96,1
G(P) <sup>b</sup> $\rightarrow$ L(6S)	103,1	100,7
G(P) <sup>b</sup> $\rightarrow$ LA2M	102,1 – 102,5	98,7
G(P) <sup>b</sup> $\rightarrow$ LA2S	102,1 – 102,5	96,7

<sup>a</sup>Díades de C2S-3.

<sup>b</sup>Unidades A ( $\beta$ -D-galactopirranose) que podem estar substituídas por acetal de ácido pirúvico nos carbonos 4 e 6.

A hidrólise redutiva parcial em condições mais brandas aliada à estabilidade de grupos sulfato em C-2 das unidades anidrogalactosídicas, permitiu a obtenção de um despolimerizado rico em unidades de 3,6-anidro- $\alpha$ -L-galactose 2-sulfato (LA2S). Isto pode ser observado pela análise de metilação (Tabela-12), e pelo sinal em 96,7 ppm no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura-12), correspondente ao C-1 desta unidade.

Este despolimerizado também mostrou um incremento de unidades piruvatadas, pela presença de 7,5 mol% de galactose na análise de metilação.

Desta forma a despolimerização se torna uma ferramenta útil na análise de polissacarídeos complexos.

#### 4.1.9- ANÁLISES GERAIS DA FRAÇÃO C1S

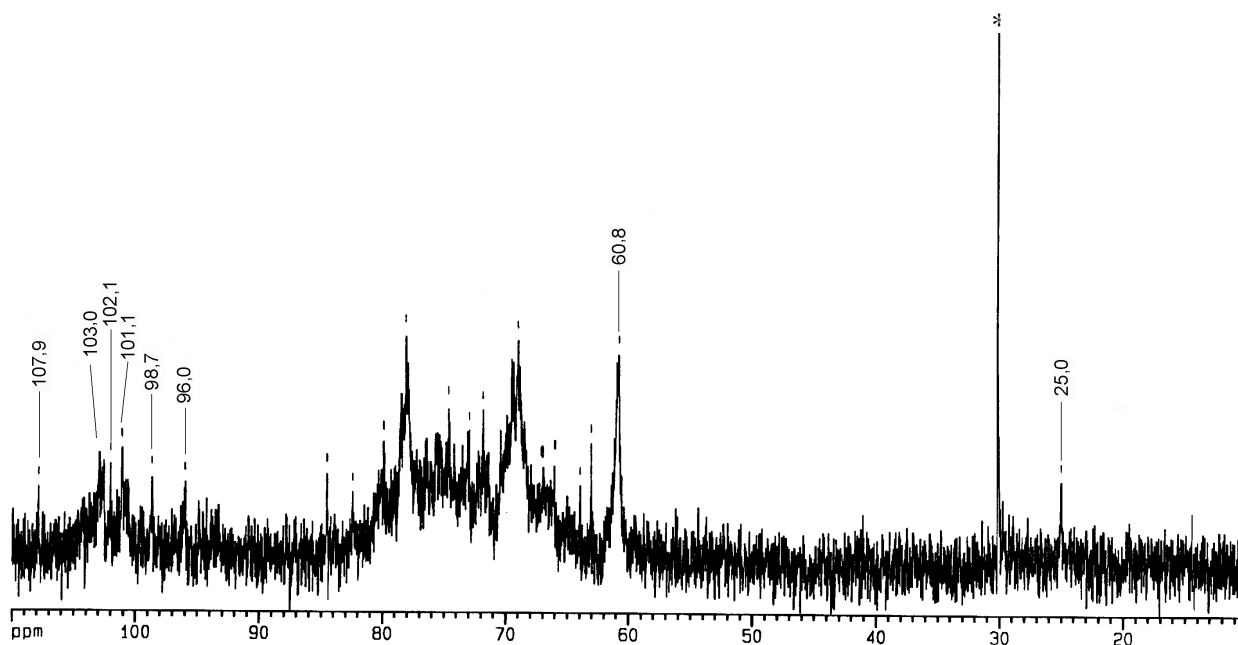
A fração C1S de *C. crenulata*, obtida por extração aquosa a 25°C e subsequente tratamento com KCl 2M (Esquema-2) (ZIBETTI, 2001), representa 94% da fração bruta (C1) que permaneceu solúvel em KCl 2M (Esquema-1, p. 52).

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , desta fração solúvel em KCl 2M (Figura-13), apresenta um sinal na região anomérica em 107,9 ppm, que não é comum nos espectros de galactanas de algas vermelhas. Uma possibilidade é que este sinal poderia ser correspondente ao carbono quaternário, de acetal de ácido pirúvico ligado aos carbonos 3 e 4 de unidades de  $\beta$ -galactose (GORIN et al., 1982). Como visto anteriormente a substituição por acetal de ácido pirúvico é comum em algas vermelhas, porém esta substituição só foi observadas nos carbonos 4 e 6 das unidades de  $\beta$ -galactose (HIRASE et al., 1967, CHIOVITTI et al., 1997 e 1998).

Este substituinte (acetal de ácido pirúvico), é comum em polissacarídeos extracelulares de bactérias (GAREGG et al., 1980), e também tem sido observado em polissacarídeos de origem animal (GORIN et al., 1982).

Através da análise do espectro de HMQC da fração C1S (Figura-14), foi possível observar que o sinal em 107,9 ppm está correlacionado com um próton, cujo sinal é 5,08 ppm. Caso o sinal em 107,9 ppm fosse de um carbono acetálico quaternário, este não poderia ter nenhum próton correlacionado. Portanto este sinal não corresponde a substituição de ácido pirúvico nos carbonos 3 e 4 de unidades de  $\beta$ -galactose.

FIGURA-13 ESPECTRO DE RMN de  $^{13}\text{C}$  DO EXTRATO C1S DE *C. crenulata*.



Análise realizada à 60°C em  $\text{D}_2\text{O}$ , concentração das amostras 40 mg/mL.

\*Sinal correspondente à acetona utilizada como padrão interno ( $\delta = 30,2$  ppm).

Outra possibilidade é que este sinal (107,9 ppm), poderia ser correspondente ao C-1 de unidades de  $\beta$ -D-galactofuranose. Estas unidades furanosídicas também não são comuns em galactanas de algas vermelhas. Porém em uma fração polissacarídica obtida de *Kappaphycus alvarezii* (ESTEVEZ et al., 2004), foi observado um sinal em 109,6 ppm, que poderia ser correspondente a ramificações de uma única unidade de  $\beta$ -D-galactofuranose. A presença deste tipo de unidade não pode ser confirmada, pois o espectro de massa desta fração metilada, hidrolisada e acetilada, não apresentou fragmentação correspondente a 2,3,5,6-tetra-O-metil-galactitol. Desta forma o aparecimento destas unidades galactofuranosídicas poderia ser proveniente de uma contaminação do material.